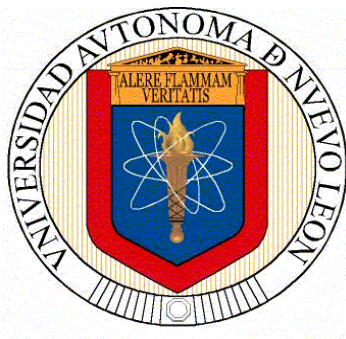


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE
lncRNAs y miRNAs EN MUESTRAS DE CITOLOGÍA EN
BASE LÍQUIDA Y SU APLICACIÓN COMO BIOMARCADORES
TEMPRANOS EN CÁNCER CERVICOUTERINO”**

PRESENTADA POR:

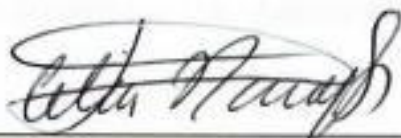
JUAN ÁNGEL GARCÍA QUIÑONES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

JULIO 2018

Evaluación de los niveles de expresión de *lncRNAs* y *miRNAs* en muestras de citología en base líquida y su aplicación como biomarcadores tempranos en Cáncer cervicouterino.

Aprobación de tesis:



Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Directora de Tesis



Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez

Co-directora de Tesis



Dr. C. Antonio Ali Pérez Maya

Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Genómica y Bioinformática perteneciente al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio Nacional Biobanco del CONACyT, en colaboración con el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de la UANL, bajo la Dirección de la Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez, la Co-Dirección de la Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez y miembro de la comisión el Dr. Antonio Alí Pérez Maya.

Agradecimientos

Agradezco a mi comisión de tesis por todo el apoyo brindado, sin el cual este proyecto no hubiese sido posible.

Al personal administrativo, especialmente a Juany por siempre estar al pendiente de nosotros los estudiantes.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Mariel y Kame por todo el apoyo brindado.

A mis compañeros estudiantes, sin duda hicieron más ameno cada uno de los momentos vividos.

Especialmente a mi familia, gracias a la cual tengo la oportunidad de estar escribiendo estos agradecimientos en mi tesis de posgrado.

Dedicatoria

Esta tesis es especialmente dedicada a mi familia: A mi mamá Julia Quiñones, mi papá Juan García, mi hermana Linda García y mí ahijado Tadeo, los cuales son una parte muy importante de mi vida. Me han apoyado siempre y hacen que mi existencia sea mucho más bella.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
CAPÍTULO I.....	11
INTRODUCCIÓN.....	11
1. El cáncer cervicouterino.....	11
2. Epidemiología.....	11
3. Diagnóstico del CaCU.....	11
4. RNAs no codificantes.....	15
4.1 ¿Qué son los lncRNAs?.....	15
4.2 Clasificación de lncRNAs.....	16
4.3 lncRNAs y el cáncer.....	17
4.4 Papel de los lncRNAs como biomarcadores.....	19
5 ¿Qué son los micro RNAs?.....	19
5.1 La biogénesis.....	19
5.2 Papel de los miRNAs en el CaCU.....	21
6 Las nuevas tecnologías aplicadas al diagnóstico: PCR digital en gotas.....	22
6.1 ¿Qué es la PCR digital en gotas?.....	22
6.1.1 PCR digital en gotas o Droplet digital PCR (ddPCR).....	22
6.1.2 Fundamento de la ddPCR.....	23
6.1.3 Aplicaciones de la ddPCR.....	24
6.1.4 Modalidad de agentes intercalantes.....	27
6.1.5 Modalidad de sondas Taqman.....	29
7 Antecedentes directos.....	30
CAPÍTULO II.....	32
JUSTIFICACIÓN.....	32
CAPÍTULO III.....	33
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33

CAPÍTULO IV	34
MATERIAL Y MÉTODOS	34
1. Estrategia general	34
2. Lugar de trabajo	36
3. Reactivos, materiales y equipos	36
3.1 Reactivos	36
3.2 Material	37
3.3 Equipos	37
4 Métodos	37
4.1 Extracción de ADN, ARN y miRNAs	37
4.2 Diseño de la prueba de genotipificación viral mediante ddPCR	40
4.3 Digestión ADN genómico previo a ddPCR	40
4.4 Genotipificación viral mediante ddPCR	40
4.5 Retrotranscripción	42
4.6 Evaluación de los niveles de expresión de miRNAs y lncRNAs	43
CAPÍTULO V	45
RESULTADOS	45
1. Seleccionar los grupos de estudio y explorar la cuantificación viral de VPH's de alto riesgo mediante ddPCR	45
1.1 Detección y cuantificación de VPH 16	53
1.2 Detección y cuantificación de VPH 18	54
2. Cuantificar los niveles de expresión del lncRNA MALAT 1 en muestras de citología en base líquida (CBL) mediante ddPCR	56
2.1 Optimización de la cuantificación de MALAT 1 y GAPDH mediante ddPCR	56
2.2 Cuantificación de MALAT 1 y GAPDH en muestras de CBL mediante ddPCR	58
3 Cuantificar los niveles de expresión del miR-34a en muestras de CBL mediante ddPC	60
CAPÍTULO VI	62
DISCUSION DE RESULTADOS	62
CAPÍTULO VII	66
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación del VPH.....	14
Tabla 2	Condiciones de reacción ddPCR Evagreen.....	41
Tabla 3	Etapas de amplificación ddPCR Evagreen.....	41
Tabla 4	Retrotranscripción.....	42
Tabla 5	Condiciones de reacción ddPCR Sondas Taqman.....	43
Tabla 6	Etapas de amplificación ddPCR Sondas Taqman.....	44
Tabla 7	Primers empleados.....	45
Tabla 8	Amplitudes de señal.....	52
Tabla 9	Detección y cuantificación de VPH 16.....	53
Tabla 10	Cociente del No. de copias de VPH 16 por célula.....	54
Tabla 11	Detección y cuantificación de VPH 18.....	55
Tabla 12	Cociente del No. de copias de VPH 18 por célula.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de las lesiones cervicales.....	13
Figura 2 Pruebas para la detección de lesiones y CaCU	13
Figura 3 Colposcopia.....	14
Figura 4 Citología en base líquida.....	14
Figura 5 Funciones de los lncRNAs en la regulación génica.....	16
Figura 6 Papel de los lncRNAs en los Hallmarks del cáncer.....	18
Figura 7 Vía de procesamiento canónica de miRNAs.....	20
Figura 8 Esquema de las etapas de ddPCR.....	24
Figura 9 Mecanismo de detección del producto amplificado.....	27
Figura 10 Detección de fragmentos mediante Evagreen.....	28
Figura 11 Interpretación de resultados Evagreen.....	28
Figura 12 Fundamento de sondas Taqman	29
Figura 13 Propuesta.....	31
Figura 14 Estrategia general.....	34
Figura 15 Optimización de la Tm.....	46
Figura 16 Gráficos de amplitud e histograma de señal característicos.....	47
Figura 17 Gráfico e histograma de amplitud de señal de VPH 16.....	48
Figura 18 Gráfico e histograma de amplitud de señal de VPH 18.....	49
Figura 19 Gráfico e histograma de amplitud de señal de VPH 51.....	50
Figura 20 Gráfico e histograma de amplitud de señal de controles de amplificación.....	51
Figura 21 Gráfico de correlación del número de copias por célula de VPH 16.....	54
Figura 22 Integración de los gráficos de amplitud de señal.....	56
Figura 23 Curvas de correlación de ADN complementario.....	57
Figura 24 Gráfico de amplitud de señal e histograma de amplitud de señal MALAT 1...58	
Figura 25 Resultados cociente de No. de copias MALAT1/GAPDH.....	59
Figura 26 Resultados No. de copias absoluto de MALAT1.....	60
Figura 27 Resultados cociente del No. de copias de miR34a/RNU6B.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

Ago2: Argonauta

ARN: Ácido Ribonucleico

CaCU: Cáncer Cervicouterino

CIN: Neoplasia intraepitelial

ddPCR: Droplet digital PCR

G: Gravedades

lncRNAs: ARNs largos no codificantes

lincRNAs: ARNs largos no codificantes intergénicos.

min: minutos

miRNAs : micro RNAs

ng: nanogramos

Pap : Papanicolau

pri-miRNA : Precursor de micro RNAs

qPCR : PCR en tiempo real

RISC: Complejo de silenciamiento asociado a ARN

s: segundos

ul : Microlitros

VPH: Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular
Presenta: **Juan Ángel García Quiñones**

Evaluación de los niveles de expresión de *lncRNAs* y *miRNAs* en muestras de citología en base líquida y su aplicación como biomarcadores tempranos en Cáncer cervicouterino.

Introducción: El cáncer cervicouterino (CaCU) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello uterino y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones intraepiteliales precursoras de lenta y progresiva evolución, el 99 % de los casos están vinculados con infecciones genitales por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, la cual es la infección vírica de transmisión sexual más común del aparato reproductor. A nivel mundial, esta neoplasia ocupa el cuarto lugar de incidencia de cáncer en mujeres, con un número estimado de 266 000 muertes y unos 528 000 nuevos casos en 2012. Ese mismo año el CaCU representó el segundo lugar de incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas. La mayoría de las mujeres infectadas con VPH eliminan la infección, las mujeres que no logran eliminar el virus (que presentan infecciones persistentes) pueden desarrollar lesiones de alto y bajo grado y posteriormente cáncer. Actualmente no se cuenta con una prueba sensible y específica que permita predecir el riesgo para el desarrollo del CaCU. Diversos grupos de investigación han propuesto la implementación de la citología en base líquida (CBL) para la detección y cuantificación de posibles biomarcadores tempranos de lesiones premalignas y así detectar a las pacientes con riesgo a CaCU, en este ámbito los *lncRNAs* y *miRNAs* han mostrado resultados prometedores.

Objetivo: Evaluar los niveles de expresión de *lncRNA MALAT 1* y *miR-34a* en muestras de citología en base líquida (CBL) mediante ddPCR, analizando su posible aplicación como biomarcadores tempranos de lesiones premalignas y CaCU.

Métodos: Se diseñaron y optimizaron pruebas para la detección y cuantificación de muestras VPH 16,18 y 51 positivas, empleando ddPCR (droplet digital PCR). Posteriormente se realizó la extracción de ADN y ARN de 67 muestras de CBL provenientes de la consulta de colposcopia del Hospital Universitario José Eleuterio González UANL. A partir de ARN se realizó una retrotranscripción y se evaluaron los niveles de expresión del *lncRNA MALAT1* (n=67) y *miR34a* (n=29) mediante ddPCR.

Resultados: Se diseñó y optimizó un método para detectar y cuantificar VPH 16, 18 y 51 mediante ddPCR, encontrándose en el caso del VPH 16 y 18 una correlación entre los datos obtenidos mediante ddPCR y resultados previos de PCR en tiempo real (qPCR). Se encontró una asociación entre la sobreexpresión de *MALAT 1* y la positividad de VPH ($p=0.008$) y carga viral alta ($p=0.027$). No se encontró asociación con el grado de la lesión ($p=0.756$) ni con las muestras que presentaban coinfecciones (0.237). Por otro lado se identificó una asociación entre la subexpresión de *miR-34a* y la positividad de VPH ($p=0.010$), monoinfecciones ($p=0.021$), coinfecciones ($p=0.030$), carga viral baja ($p=0.042$) y alta ($p=0.014$), pero no se encontró asociación con el grado de la lesión ($p=0.190$).

Conclusiones: Los niveles de expresión del *lncRNA MALAT 1* y el *miR-34a*, están asociados con el estatus del VPH(+/-), la coinfección y la carga viral pero no con el grado de las lesiones precursoras del CaCU.

Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Directora de tesis

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.- El cáncer cervicouterino (CaCU).

El cáncer cervicouterino (CaCU) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello uterino y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones intraepiteliales precursoras de lenta y progresiva evolución (Figura 1), el 99 % de los casos de CaCU están vinculados con infecciones genitales por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (Tabla 1), la cual es la infección vírica de transmisión sexual más común del aparato reproductor (1,2).

2.- Epidemiología del CaCU.

A nivel mundial, esta neoplasia ocupa el cuarto lugar de incidencia de cáncer en mujeres, con aproximadamente 266 000 muertes y unos 528 000 nuevos casos en 2012. Ese mismo año, representó el segundo lugar de incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas (3). Se han implementado medidas de prevención, seguimiento y tratamiento para el CaCU, sin embargo las medidas tomadas no han sido efectivas y actualmente las estadísticas nacionales reflejan la gran necesidad de disminuir la incidencia y mortalidad en nuestro país.

Se estima que en el año 2013, en mujeres de 25 años y más, se registraron 3,771 defunciones con una tasa de 11.3 defunciones por 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad son Morelos (18.6), Chiapas (17.2) y Veracruz (16.4) (4).

3.- Diagnóstico del CaCU.

Desde 1943, la prueba de Papanicolaou (Pap) ha sido el estándar de oro para la detección y seguimiento de CaCU (Figura 2), permitiendo detectar las alteraciones morfológicas celulares en el cuello uterino (4), con aproximadamente un 98 % de especificidad pero con una sensibilidad de tan solo el 51 %. El Pap posee una alta tasa de falsos negativos, lo que representa que casi la mitad de las pacientes que se realizan la prueba, a pesar de ser diagnosticadas sin alteración, realmente pudiesen presentar una lesión pre-maligna y no estar recibiendo atención oportuna.

Cuando a una mujer se le detecta una alteración en la prueba del Pap, es referida a la consulta de colposcopia (Figura 3) para confirmar el diagnóstico a través de la observación de la lesión y mediante la toma de una biopsia. Estas herramientas son de gran utilidad, sin embargo, las unidades médicas que cuentan con equipamiento para realizar la colposcopia son limitadas en nuestro país y miles de mujeres no tienen acceso a un seguimiento y control adecuado, culminando lamentablemente en CaCU.

La detección del VPH en citologías en base líquida (Figura 4) permite en la actualidad identificar a las mujeres portadoras del virus, pero ésta prueba sólo identifica la infección y no contamos con una prueba sensible y específica que nos permita predecir el riesgo de esa paciente para el desarrollo del CaCU. La gran mayoría de las pacientes (99%) eliminan el virus y el alto costo de la colposcopia complica el seguimiento.

La técnica ampliamente utilizada y aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) es la captura de híbridos, la cual consiste en un ensayo que emplea sondas de ARN complementarias a algunos genotipos del VPH, formando así un híbrido de ADN-ARN, que es reconocido por un anticuerpo específico y mediante amplificación de la señal por quimioluminiscencia, es posible detectar la presencia del VPH en la muestra. Permite distinguir VPH de alto y bajo riesgo, regularmente se acopla con técnicas para la tipificación específica como ejemplo son la hibridación con sondas tipo-específicas, secuenciación de regiones conservadas o análisis de patrones de restricción. Se reporta que el acoplamiento de métodos sensibles para detectar ADN del VPH con la prueba de pap, aumenta la sensibilidad de detección, es decir si una paciente es negativa para el ADN del VPH y tiene una prueba de pap sin alteración, el médico puede tener la seguridad de que no hay riesgo de lesión premalignas (6).

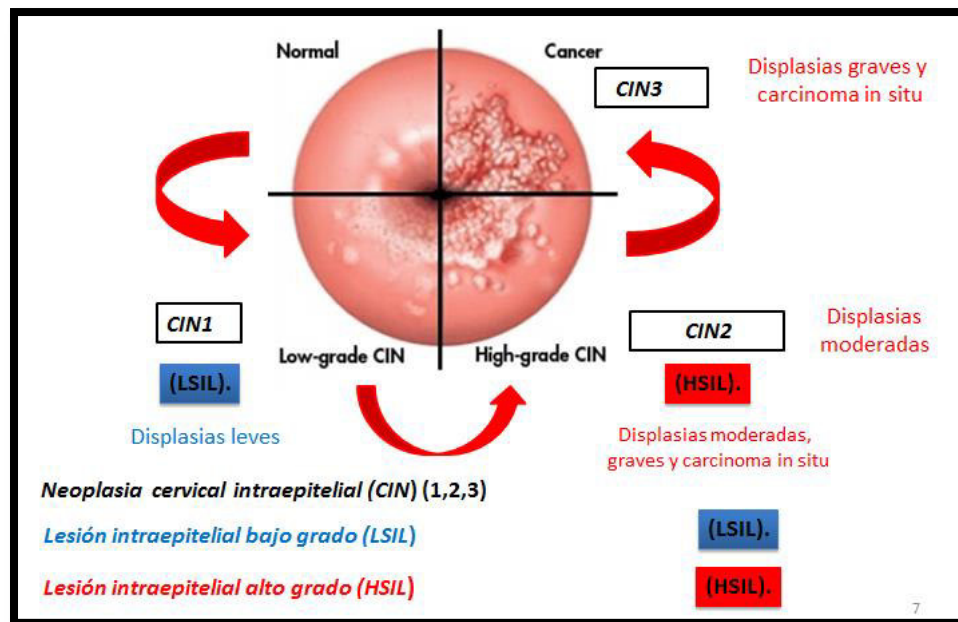


Figura 1. Clasificación de las lesiones cervicales. De acuerdo a la convención de Bethesda 1988, el cual es un sistema binario para catalogar las anomalías celulares preneoplásicas en el extendido citológico, denominando las lesiones intraepiteliales escamosas de alto o bajo grado. El término alto grado incluye el CIN 2 y CIN 3, el término bajo grado incluye CIN 1 y alteraciones celulares producidas por el VPH. Estas clasificaciones son complementarias y no mutuamente excluyentes (7)

A



B

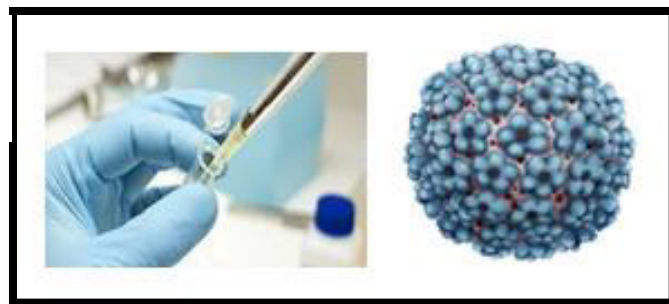


Figura 2. Pruebas para la detección de lesiones y CaCU. A) La Citología de Pap o Papanicolau es el estándar de oro, mediante la observación de las alteraciones morfológicas en extensiones de células teñidas, permite el diagnóstico de lesiones cervicales premalignas y CaCU, (Especificidad 94 % y sensibilidad de 50-70 %). B) Detección y genotipificación del VPH (Especificidad ~60 % Sensibilidad 86-93 %).

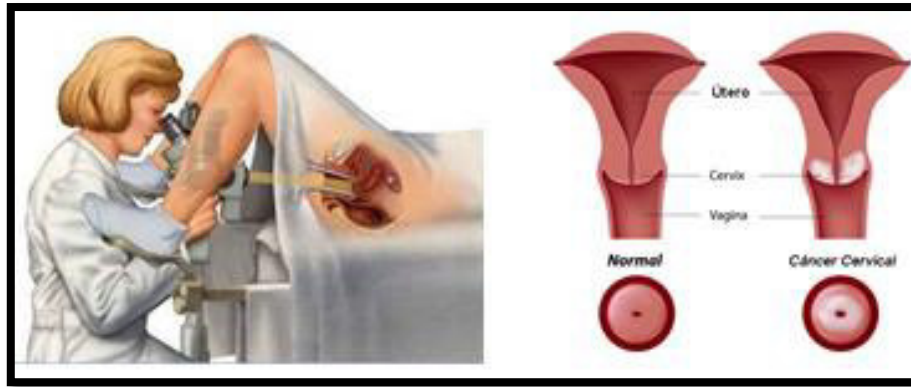


Figura 3. Colposcopia. Procedimiento médico diagnóstico que a través del empleo de un instrumento óptico denominado colposcopio y la aplicación de ácido acético, permite observar in situ las lesiones cervicales.

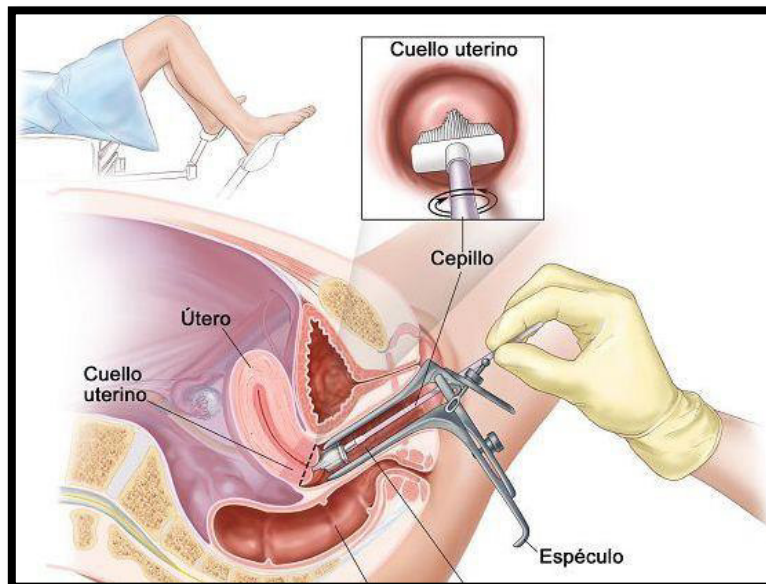


Figura 4. Citología en base líquida. Consiste en la toma de una muestra de células cervicales de ectocervix mediante arrastre con un cepillo especial, posteriormente estas células se resuspenden en un líquido y a partir de allí se puede realizar la extracción de DNA, ARNs y otras moléculas de interés diagnóstico.

Tabla 1 Clasificación del VPH en función de su asociación con el CaCU. Los VPHs de alto riesgo se han encontrado implicados en generación de lesiones premalignas y cáncer. Los VPHs de bajo riesgo se asocian principalmente con la generación de condilomas y otras lesiones con baja significancia clínica Recopilada de Muñoz N et al.2003.

Clasificación	Tipo
Alto riesgo	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 y 68.
Bajo riesgo	6,11,40,42,43,44,54,61,70

4. ARNs no codificantes

El genoma humano contiene > 20,000 genes que codifican proteínas de acuerdo con el análisis de transcriptoma de alto rendimiento, que representan aproximadamente el 2% del genoma completo, y la fracción no codificante abarca aproximadamente el 97.2% del genoma humano. Al principio se suponía que la mayoría de los ARN no codificantes no tenían función y se trataban como material genético “basura”. Actualmente se ha demostrado que la región no codificante puede transcribir ARNs cortos o largos no codificantes (LncRNAs) conformando estos últimos cerca del 80 % de los elementos transcritos no codificantes (ncRNA), los cuales juegan un papel muy importante emergiendo como reguladores de la expresión génica y de algunos procesos celulares mediante diversos mecanismos. Los lncRNAs corresponden al 25% del ARN total en la célula humana (Figura5), interesantemente se destaca que estos elementos forman redes de intercomunicación con otros subtipos de ARNs, como mensajeros y micro RNAs, creando una red de interacciones que pueden estar involucradas en los mecanismos del cáncer (8).

Existen reportes recientes en los cuales se ha estudiado los micro ARNs (miRNAs) y ARN largos no codificantes (lncRNAs) como marcadores moleculares de lesiones premalignas y CaCU, mostrando resultados alentadores.

4.1 ¿Qué son los lncRNAs?

Los lncRNA son ARNs eucariotas de longitud mayor a 200 nucleótidos, cuya expresión es distinta de los genes que codifican proteínas y dependen del contexto tisular y celular. La mayoría de los lncRNAs son transcritos intergénicos o antisentido que comparten algunas similitudes de transcripción con los ARN mensajeros, carecen de un marco de lectura abierto extendido, su transcripción depende de la ARN polimerasa II y están bajo el control de los activadores transcripcionales del complejo SWI / SNF. Suelen ser procesados de manera similar a los ARN mensajeros y se calcula que corresponden al 25 % del ARN total. (8, 9,10).

Los lncRNAs pueden estar presentes en cada compartimiento celular, donde interactúan con las proteínas y la cromatina gracias a las estructuras secundarias, como los bucles del tallo y las horquillas, adquiridas mediante modificaciones postranscripcionales. Estas estructuras secundarias les permiten realizar diversas funciones (8). Los lncRNAs pueden

actuar como andamios para atraer complejos de proteínas, ya que pueden guiar a proteínas como factores de transcripción a sus dianas de ADN; en la cromatina se doblan para actuar como potenciadores de la transcripción, o actuar como andamios moleculares para los complejos de remodelación de la cromatina. Todo esto permite a los lncRNAs cumplir un papel crucial en diversos procesos celulares (8) (Figura 5).

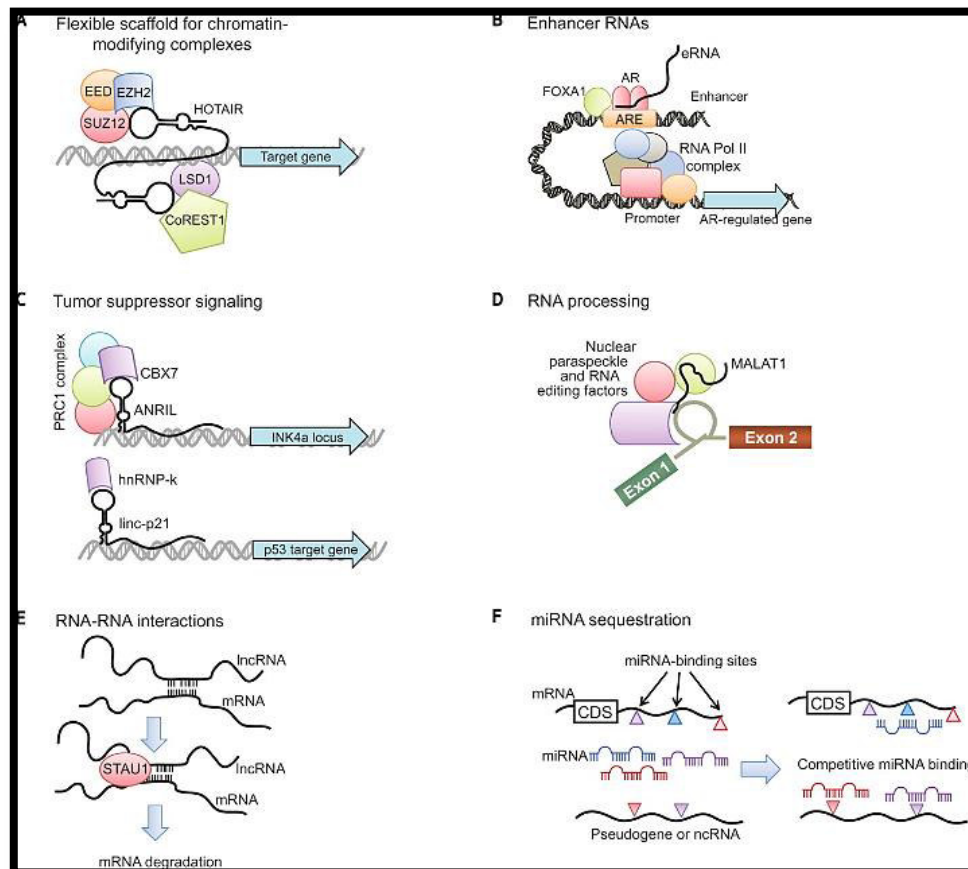


Figura 5. Funciones de los lncRNAs en la regulación génica. En la figura se ilustran los procesos de regulación génica en los cuales se ha involucrado a los lncRNAs, tales como: A) Remodelación de la cromatina, participando como andamios estructurales. B) Como potenciadores de la transcripción. C) Involucrados en las vías de señalización de supresión tumoral. D) Procesamiento del ARN. E) Degradación del ARN. F) Secuestro o captura de miRNAs. (Recopilada de John R. 2011).

4.2 Clasificación de lncRNAs

Existen diversas formas de clasificar los lncRNAs, las clasificaciones existentes se basan en sus propiedades descriptivas y distintivas: tamaño, localización genómica (asociación con genes codificantes), función, semejanza con ARN mensajero, elementos repetitivos, vía o estabilidad bioquímica, grado de conservación, asociación con estados biológicos,

localización subcelular, entre otros (6). Una forma común de clasificarlos es de acuerdo con la ubicación genómica, es decir, desde donde se transcriben estos ARNs en el genoma, en relación con los marcadores bien establecidos, como los genes que codifican proteínas. De esta manera, los lncRNAs se pueden agrupar en cinco categorías amplias pero mutuamente no excluyentes (9,10).

Elementos que se transcriben antisentido, pseudogenes, ncRNAs intrónicos largos, transcritos divergentes, transcripciones asociadas a promotores, ARNs potenciadores y lncRNAs independientes, estos últimos son de importancia para este trabajo debido a que es en el que se encuentra nuestro lncRNA en estudio. Los pertenecientes a este grupo no se superponen con genes codificantes, algunos han sido denominados como lincRNAs (RNAs largos no codificantes intergénicos). La mayoría son transcritos por la pol II, poliadenilados y procesados por corte y empalme, y poseen una longitud aproximada de 1 kb. Ejemplos de ellos son Xist, H19, HOTAIR y MALAT (10).

4.3 lncRNAs y cáncer

Se ha explorado el papel que juegan los lncRNAs y su relación con el cáncer. Sus funciones pueden dividirse de acuerdo a su influencia en:

- **El estado de la cromatina y la metilación:** La remodelación de la cromatina fue una de las primeras funciones identificadas, esto se logra principalmente a través de la interacción con PRC2, una proteína que interactúa con histonas inhibitorias favoreciendo la inactivación de la cromatina. Otro mecanismo que se ha observado es mediante el reclutamiento de ADN metil transferasas o interacción con el complejo SWI/SNF. Algunos lncRNAs tienen la capacidad de inducir la activación de la cromatina a través del marcaje H3K4me3. Como ejemplo de lncRNAs modificadores de cromatina tenemos a ANRIL, FGFR2 PCE3, Kcnq1ot1, TARID, AS1DHRS4, DACOR1, SChLAP1, Firre, HOTTIP y CCAT1-L (11).
- **La estabilidad de proteínas y complejos:** Algunos ejercen su función oncogénica mediante la interacción directa con proteínas o complejos proteicos que actúan como andamios activadores, interacción y modificación de actividad de factores de transcripción (11).
- **Actuando como secuestradores de micro ARNs:** Algunos son capaces de actuar como ARN competitivos al unirse a micro ARNs, inhibiendo su función. Como

ejemplo de estos tenemos a UCA1, ERBB4, MEG3, ZFAS1, Linc-RoR y CASC2 (11).

Se ha propuesto que los lncRNAs están implicados en el desarrollo del cáncer , a través de la alteración de mecanismos celulares que llevan a la señalización de crecimiento autosostenido, la insensibilidad a la inhibición del crecimiento, la evasión de apoptosis, la proliferación descontrolada, angiogénesis, la invasión tisular y la metástasis (Figura 6) (11, 12).

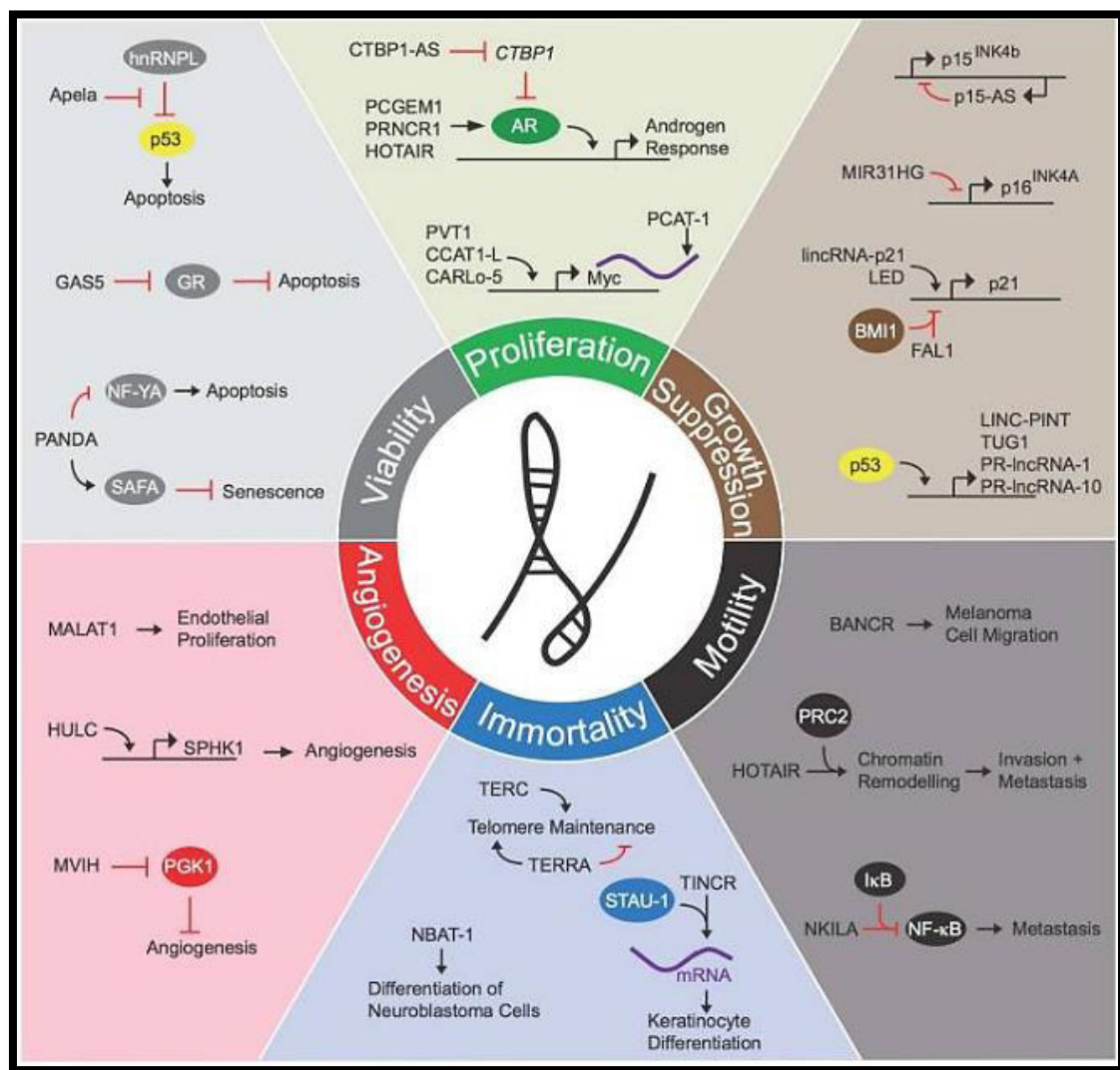


Figura 6. Papel de los lncRNAs en los Hallmarks del cáncer. Se ilustra como participan en los 6 Hallmarks del cáncer: proliferación, crecimiento, motilidad, inmortalidad, angiogenesis y viabilidad. Es de nuestro interés ejemplificar como se ha propuesto la participación de MALAT 1 en la angiogenesis. Recopilado de Schmitt AM 2016.

4.4 Papel de los lncRNAs como biomarcadores.

Se han realizado algunos estudios en los cuales se ha demostrado la estabilidad en condiciones extremas de los lncRNAs de diferentes fluidos corporales por lo cual puede ser factible su aplicación como biomarcadores (13).

Los primeros lncRNAs que se relacionaron con el cáncer fueron h19, MALAT1 y PCA3, esta relación se estableció debido a la expresión diferencial en tejido tumoral respecto al tejido sano (11). A partir de entonces se ha realizado la exploración utilizando diferentes tecnologías como qPCR, microarreglos de expresión global y secuenciación de nueva generación.

Recientemente, Gibb EA y cols. realizaron el análisis de bibliotecas L-SAGE construidas a partir de muestras cervicales y construyeron el primer perfil de expresión de lncRNA del cuello uterino compuesto por 1056 lncRNAs. Demostraron una expresión aberrante en lesiones de bajo grado (14). Jung H. y cols. reportaron que una sobreexpresión de lncRNA HOTAIR en tejido tumoral de CaCU, está relacionado con menor supervivencia (15). Jian Y. y cols evidenciaron la sobreexpresión de MALAT 1 en lesiones VPH (+) comparado con tejido sano (16). Por su parte Yang L. y cols reportaron que la sobreexpresión de MALAT 1 en tejido tumoral de CaCU está relacionada con menor supervivencia (17), Xu S. y cols evidenciaron que MALAT 1 juega un papel importante en la transición epitelio mesenquimal en cáncer a través de la activación de la vía PI3K-AKT (18). Hua Zhu y cols. identificaron 3,356 lncRNAs con un patrón de expresión diferencial en tejidos de CaCU en comparación con los tejidos adyacentes no cancerosos, de los cuales 1857 de ellos sobreexpresados (19).

5. ¿Qué son los micro ARNs?

Los microARNs (miRNAs) son una clase de ARN pequeños (~ 22 pb) no codificantes que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional, se unen a la región 3' no traducida (3'-UTR) de los ARN mensajeros diana, causando la inhibición de la traducción o degradación del ARN mensajero (20).

5.1 La biogénesis de los miRNA

La vía de procesamiento de miRNAs se ha visto desde hace tiempo como lineal y universal para todos los miRNAs de mamíferos. Esta maduración canónica incluye la

producción del transcrito de miRNA primario (pri-miRNA) aproximadamente de 1000 pb por la ARN polimerasa II o III (20 %) y la escisión del pri-miRNA por el complejo Drosha-DGCR8 (Pasha) en el núcleo. La horquilla precursora resultante, el pre-miRNA (60 a 70 pb) se exporta desde el núcleo mediante Exportina-5-Ran-GTP. En el citoplasma, la RNasa Dicer forma un complejo con la proteína de unión a ARN de doble cadena TRBP que escinde la horquilla pre-miRNA a su longitud madura. La cadena funcional del miRNA maduro se carga junto con proteínas Argonauta (Ago2) en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), el cual guía al RISC para silenciar los ARN mensajeros diana a través de la escisión, represión traduccional o desadenilación, regulando así casi el 33% de los genes codificantes (21) (Figura7).

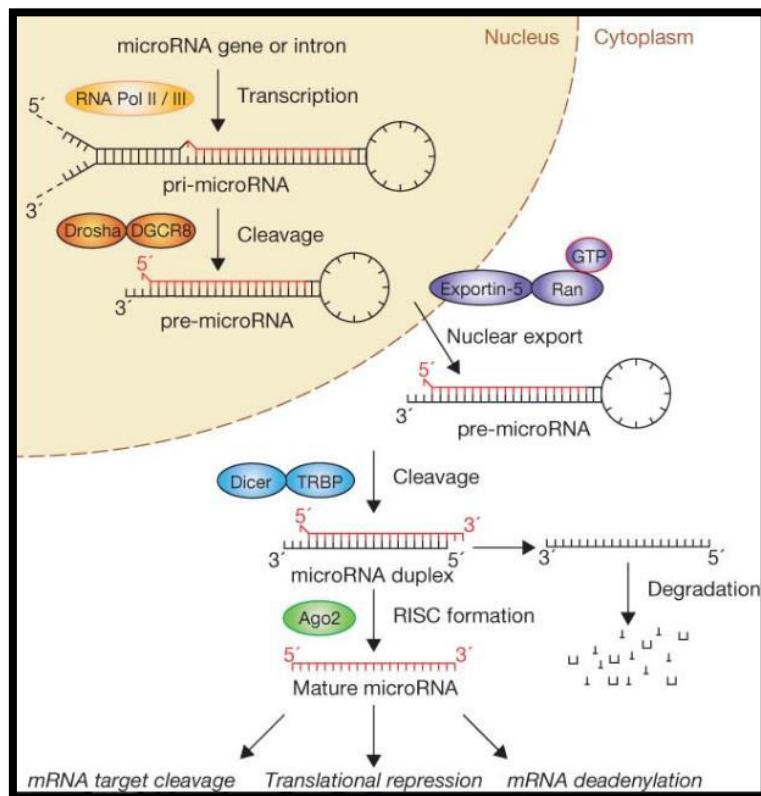


Figura 7. Vía de procesamiento canónica de miRNAs. Se ilustra la vía de procesamiento de los miRNAs, la cual comienza con la producción del transcrito de miRNA primario (pri-miRNA) y la escisión del pri-miRNA por el complejo Drosha-DGCR8 (Pasha) en el núcleo. La horquilla precursora resultante, el pre-miRNA se exporta desde el núcleo mediante Exportina-5-Ran-GTP. En el citoplasma, la RNasa Dicer forma un complejo con la proteína de unión a ARN de doble cadena TRBP que escinde la horquilla pre-miRNA a su longitud madura. Recopilado de Winter J 2009.

Los miRNAs están involucrados en una amplia gama de procesos biológicos como el crecimiento, el desarrollo, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular, así como

un papel dual en cáncer como supresores de tumores y oncogenes (Figura 9). Es por esto que se les ha atribuido papeles críticos en la tumorigénesis y la progresión tumoral en algunos tipos de cáncer como mama, pulmón, carcinoma hepatocelular y cáncer de páncreas. A su vez, los estudios de miRNAs en CaCU y lesiones premalignas van en aumento (22).

5.2 Papel de los miRNAs en el CaCU.

Estudiar los miRNAs en lesiones originadas por la infección por VPH y CaCU es relevante debido a que es conocido que el VPH regula miRNAs celulares creando un óptimo entorno para la replicación viral, por ejemplo, la oncoproteína E7 del VPH es capaz de regular negativamente la expresión del miR-203 y en consecuencia la regulación positiva de TP63 facilita la replicación del genoma viral. Por su parte la oncoproteína E6 origina la subexpresión del miR-34a a través de un mecanismo de desestabilización de p53 que es un transactivador de miR-34a (23,24). Otros miRNAs que se han visto desregulados por la acción de E6 son miR218 y miR23b (25, 26).

Se han realizado estudios de perfiles de expresión de miRNAs en muestras de células cervicales y se reporta que éstos se alteran en infección por el VPH y en CaCU. Wang X y cols. analizaron 158 muestras cervicales (38 tejidos normales, 52 de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y 68 de cáncer de CaCU), y reportaron que la infección por VPH induce la expresión aberrante de muchos miRNAs celulares; la sobreexpresión de miR-16, miR-25, miR-92a y miR-378 y la subexpresión de miR-22, miR-27a, miR-29a y miR-100 se atribuyó a las oncoproteínas virales E6 y E7. Una relación de expresión ≥ 1.5 de algunos miRNAs podrían ser de utilidad para distinguir la evolución del tejido cervical sano a CIN y a CaCU, tal es el caso de miR-25, miR-92a y miR-378 cuya sobreexpresión se podría relacionar con la progresión de la lesión (27). En un análisis de hibridación in situ de lesiones de bajo grado se detectó una subexpresión de miR-125 en coilocitos, los cuales son células anormales indicadoras de la infección por VPH (28). En un trabajo de Li B y cols. se evaluó los niveles de expresión del precursor pre-miR-34a en diferentes tejidos cervicales encontrándose que la expresión se redujo significativamente en lesiones de bajo grado y CaCU, en comparación con el epitelio normal, así como en lesiones de alto grado en comparación con lesiones de bajo grado (29).

Existen reportes recientes de otros grupos de investigación a nivel internacional que están estudiando los miRNAs como posibles biomarcadores de utilidad en el pronóstico de lesiones y detección temprana de CaCU.

Luo M. y cols. reportaron una sub expresión en tejido tumoral de miR-26b en comparación al tejido normal ($P < 0.001$) (20). Otro estudio interesante fue el realizado por Sun Li y cols. , en el cual se incluyeron 35 muestras pareadas y reportaron que la expresión de miR-425-5p estuvo significativamente incrementada en tejido de CaCU comparado con tejido sano adyacente (30). Sunyoung P. y cols. analizaron 51 tejidos de CaCU embebidos en parafina y encontraron una sobreexpresión de algunos miRNAs en comparación con tejido sano ($P < 0,001$) (31). En un estudio realizado por Chen A. y cols. se analizaron 41 tejidos de CaCU pareados con 41 tejidos normales adyacentes y se detectó una sub expresión de miR-34a y miR-206 ($P = < 0.05$), encontrándose que estaba relacionado con una menor supervivencia (32) proponiéndolos así como posibles marcadores en CaCU.

6.- Las nuevas tecnologías aplicadas al diagnóstico: PCR digital en nanogotas.

Las tecnologías de microarreglos y secuenciación de nueva generación están permitiendo explorar a gran escala a los miRNAs y lncRNAs, por lo tanto es importante estandarizar métodos que permitan la validación de estas moléculas como posibles biomarcadores. Se debe realizar más estudios y mejoras con respecto a la estandarización de protocolos de preparación de muestras, uniformidad en métodos de extracción y controles endógenos para PCR en tiempo real con el fin de explorar su utilidad en la práctica clínica (9). Como alternativa para solucionar este problema, algunos grupos de investigación han propuesto la aplicación de PCR digital, el cual es un método sencillo de estandarizar y escalar.

6.1 ¿Qué es la PCR digital en gotas?

6.1.1 PCR digital en gotas o Droplet digital PCR (ddPCR)

La PCR digital en gotas o Droplet digital PCR (ddPCR) fue descrita por primera vez en un trabajo realizado por Sykes PJ et al 1992, en el cual se realizó la cuantificación absoluta del gen de la cadena pesada de Ig H empleando el gen N-ras como control interno. Con este método fueron capaces de cuantificar el número total de las dianas celulares deseadas presentes en la muestra (33).

En la actualidad la ddPCR es conocida como la PCR de tercera generación, que combina la PCR convencional, una tecnología de microfluídica de última generación y sistemas de detección de fluorescencia compatible con sondas marcadas o agentes intercalantes para la detección del producto amplificado, convirtiéndolo en un método potente para detectar y cuantificar ácidos nucleicos con una alta sensibilidad y especificidad (34).

6.1.2 Fundamento de la ddPCR.

La técnica permite realizar miles de reacciones de PCR simultáneamente fundamentándose en un principio de dilución y división de la muestra en miles de gotas de una superficie de aceite y un núcleo acuoso que contiene la mezcla de reacción de PCR compuesta por un buffer, dNTP, primers o sondas marcadas, ADN polimerasa y el ADN o el ADN. A continuación se lleva a cabo la amplificación en un termociclador. Finalmente las gotas son individualizadas hacia el detector del equipo por un sistema interno de microfluídica. Las gotas que contienen el producto amplificado fluorescen y se identifican como gotas positivas, las gotas negativas son las que no contienen producto amplificado. Para la emisión de fluorescencia se emplean agentes intercalantes de ácidos nucleicos, los cuales se añaden en la mezcla de reacción (por ejemplo Evagreen) o por medio de sondas marcadas (TaqMan). El conteo de gotas se integra por medio de un software utilizando la distribución de Poisson y así la concentración absoluta se calcula con gran precisión, sin la necesidad de curvas estándar o genes de referencia (34, 35) (Figura 8).

La partición en gotas depende de la plataforma de PCR digital utilizada. Un punto importante es que entre mayor número de gotas o eventos, mayor es la precisión de la cuantificación (35). Además, a comparación de la PCR en tiempo real, esta técnica ofrece las siguientes ventajas:

- ✓ No depende de la eficiencia de amplificación (no depende de 2^n).
- ✓ No requiere gen endógeno para la cuantificación.
- ✓ No requieren curvas de estandarización ni genes de referencia.
- ✓ El diseño de los experimentos es más sencillo.
- ✓ Amplio rango dinámico.

- ✓ Alta precisión, alta sensibilidad y reproducibilidad
- ✓ Rápida
- ✓ Es posible utilizarla a gran escala.

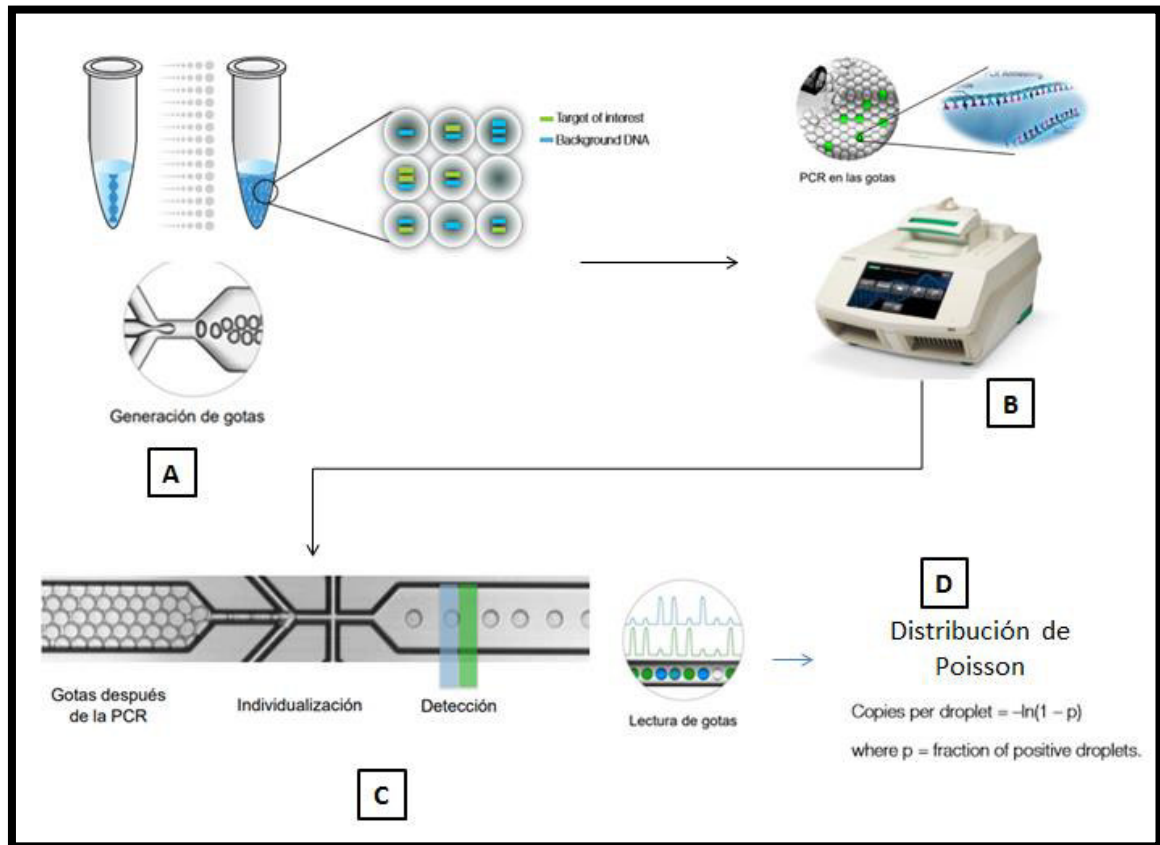


Figura 8. Esquema de las etapas de ddPCR. A) El mix de reacción que contiene el ADN o ADN complementario se mezcla con aceite en un equipo que permite la generación de miles de gotas (alrededor de 20,000) con una repartición homogénea de todos los componentes del mix. B) Se llevan a cabo simultáneamente miles de reacciones de amplificación. C) Las gotas son individualizadas, dirigidas al detector de fluorescencia y contadas como gotas positivas y negativas. D) Mediante una distribución de Poisson se determina el número de copias del blanco de interés en la muestra. Recopilada de: Droplet Digital PCR Applications Guide QX200 Biorad.

6.1.3 Aplicaciones de la ddPCR.

Esta técnica se puede adaptar para una gama de aplicaciones como:

- Análisis de variantes de número de copias.
- Detección de variantes raras
- Análisis de expresión génica y análisis de miRNAs
- Análisis de librerías para la secuenciación de nueva generación.

- Genotipificación de polimorfismos (36)

En el campo de la oncología, la ddPCR se ha convertido en una de las herramientas más precisas y confiables para el análisis de alteraciones genéticas en una amplia variedad de cánceres debido a su alta sensibilidad y especificidad, permitiendo la cuantificación absoluta de alelos, la detección de mutaciones raras, el análisis de variaciones en el número de copias, la metilación del ADN y los reordenamientos de genes en diferentes tipos de muestras clínicas, incluso para la evaluación de tejidos tumorales embebidos en parafina donde la mala calidad del ADN no ha sido un impedimento. Con esta herramienta se ha analizado una amplia gama de marcadores moleculares para fines de diagnóstico, predicción y monitoreo en diversas enfermedades. Además están en desarrollo otros enfoques que utilizan otros fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo y la orina (37).

El análisis de miRNAs se ha abordado mediante ddPCR en diferentes tipos de muestra y patologías. Por ejemplo, Jie Ma y cols. evaluaron la eficiencia de la ddPCR para la cuantificar miRNAs en plasma y su potencial utilidad como diagnóstico en cáncer. En este estudio se cuantificó el número de copias del miR-21-5p y miR-335-3p en 26 muestras de cáncer de mama y 38 controles observándose una alta linealidad, reproducibilidad y un amplio rango dinámico de 1 a 10,000 copias por microlitro. Se realizó una comparación con PCR tiempo real la cual solo fue capaz de detectar el miR-21-5p. El método proporcionó un 71.8 % de sensibilidad y un 80.6 % de especificidad para diferenciar entre pacientes con cáncer versus sujetos sanos (38). Ferracin M. y cols. evaluaron los niveles absolutos de los miRNAs: miR-320a, miR-21-5p, miR-378a-3p, miR-181a-5p, miR-3156-5p, miR-2110, miR-125a-5p, miR-425-5p, miR-766-3p en 207 muestras de distintos tipos de cáncer y controles sanos. Se validó y propuso la subexpresión del miR-181a-5p como un biomarcador para el diagnóstico de cáncer de mama (39). Mangolini A. et al evaluaron el panel de 5 miRNAs: miR-10b-5p, miR-145-5p, miR-148b-3p, miR-425-5p, miR-652-3p encontrando que miR-148b-3p y miR-652-3p se encuentran significativamente sub expresados en muestras de suero de pacientes con cáncer de mama en comparación con sujetos sanos, además la sobreexpresión del miR-10b-5p en suero se asoció con un pobre pronóstico (40).

Con respecto a los lncRNAs, Dood DW y cols validaron la plataforma de ddPCR comparando los niveles de expresión de COX-2 lncRNA y este método les permitió

evaluar los niveles de expresión absoluta de los lncRNAs MALAT1, HOTAIR, y NEAT1 en células HeLa (41). B. Lee y cols. validaron la sobreexpresión de SPRY4-IT1 en muestras de adenocarcinoma prostático en comparación con tejido sano empleando ddPCR (42).

Recientemente se comenzó a aplicar la ddPCR para la detección del ADN del VPH en diferentes tipos de muestras. Jeannot E y cols. realizaron la detección del ADN circulante del VPH en 70 muestras de suero de pacientes diagnosticadas con carcinoma invasivo asociado al VPH en estadio temprano y controles negativos (47 casos de CaCU, 15 de cáncer anal, 8 de cáncer de orofaringe y como controles negativos 18 muestras de suero de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical de alto grado asociada al virus del papiloma humano 16). Detectaron el ADN del VPH circulante en el 87 % de las muestras de suero de pacientes con carcinoma y en ninguno de los sueros de las pacientes con lesiones de alto grado, además se encontró una relación entre los niveles de ADN viral circulante y la dinámica del tumor (estadio clínico y el tamaño) en pacientes con cáncer de cuello uterino (43). Kang Z. y cols. midieron los niveles de ADN de VPH en muestras de suero de 19 pacientes con cáncer de cuello uterino metastásico VPH positivas mediante ddPCR dúplex, ellos lograron detectar el ADN circulante del VPH en todos los pacientes con cáncer y en ninguno de los 45 donantes de sangre sanos, evidenciando el papel del ADN del VPH circulante como un posible marcador tumoral prometedor (44). Por otro lado, Lee y cols. emplearon secuenciación de nueva generación para demostrar el papel del ADN del VPH circulante en la predicción de la respuesta a la quimioterapia en pacientes con carcinoma escamoso avanzado de cabeza y cuello (45).

Para la genotipificación del VPH por ddPCR, Lillsunde G y cols. cuantificaron la carga viral del VPH 16, 18, 33 y 45 en muestras de CBL y tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina, y los límites de detección fueron de 1.6 copias de VPH 16, 2.8 copias de VPH 18, 4.6 copias de VPH 33 y 1.6 copias de VPH 45. Los coeficientes de variación entre los ensayos fueron de 3.4 a 7.0% y el intraensayo de 2.6 a 8.2%. Los diseños de PCR fueron dúplex, combinando cada genotipo de VPH, con el gen de la beta globulina humana como control de amplificación (46).

6.1.4 Detección de amplicones: modalidad de agentes intercalantes.

Se puede medir la amplificación del ADN utilizando la química de EvaGreen, el cual es una molécula que emite fluorescencia al unirse al ADN de doble cadena similar al SYBR Green (36) (Figura 9).

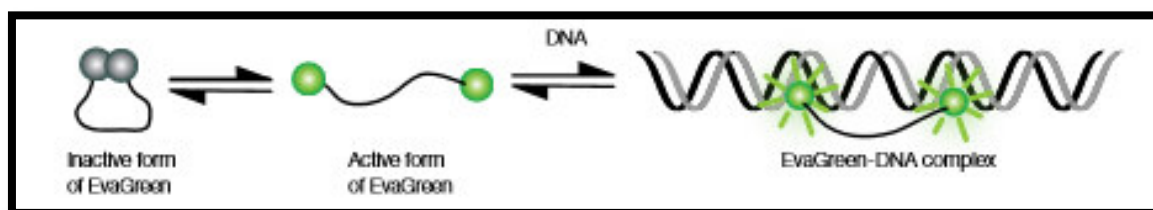


Figura 9. Mecanismo de detección del producto amplificado. El EvaGreen se une al ADN de doble cadena emitiendo fluorescencia. Los amplicones de mayor longitud tienen la capacidad de unir más moléculas de EvaGreen y por lo tanto emitir mayor cantidad de fluorescencia que los fragmentos más pequeños, esto permite cuantificar amplicones de diferente longitud en una misma muestra. Recopilada de: Droplet Digital PCR Applications Guide QX200 Biorad.

Para utilizar esta modalidad se requieren primers específicos que produzca un amplicón entre 60 a 250 pb del blanco a determinar. La amplitud de la fluorescencia emitida por cada gota depende de la longitud del fragmento amplificado y la eficiencia de la PCR (36).

Las características del sistema permiten medir la longitud o la eficiencia de la PCR, así como la capacidad para detectar múltiples blancos en una misma muestra, utilizando únicamente primers, se pueden detectar amplicones de diferentes longitudes (Figura 10). Adicionalmente con el software del equipo es posible establecer un threshold superior a la amplitud de emisión del dímero de primers y así obtener una cuantificación precisa de la molécula de interés sin la necesidad de rediseñar primers (36) (Figura 11).

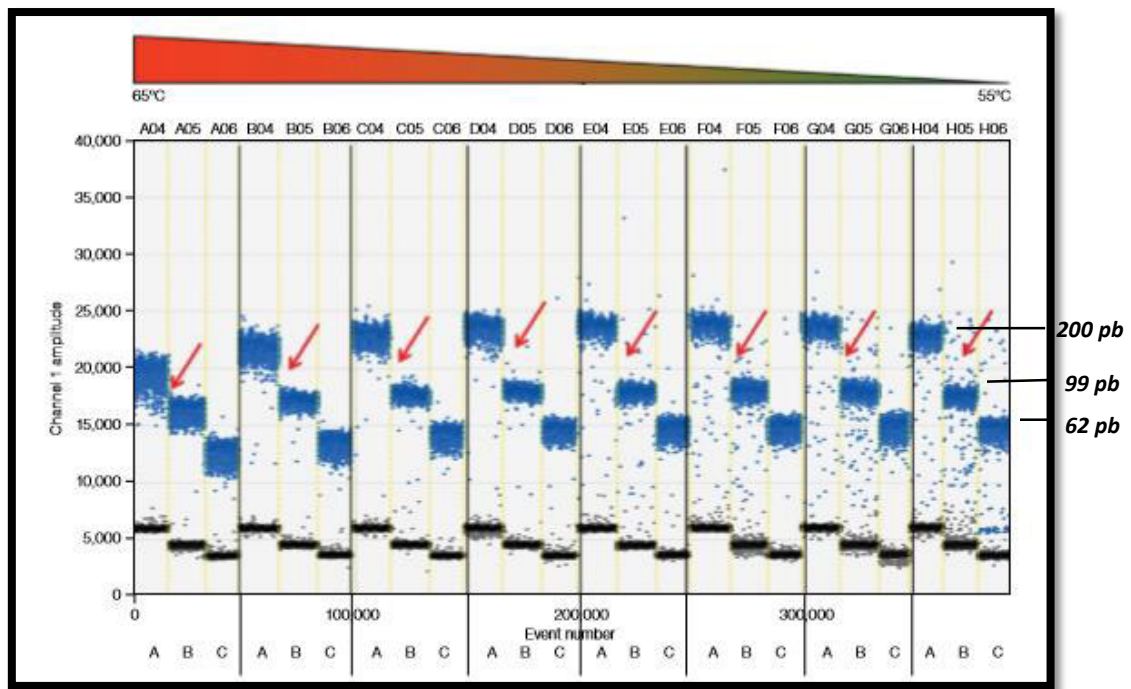


Figura 10. Detección de fragmentos mediante Evagreen. Amplicones de mayor longitud tienen la capacidad de unir más moléculas de Evagreen y por lo tanto emitir mayor cantidad de fluorescencia a comparación de fragmentos más pequeños, esto permite cuantificar amplicones de diferente longitud en una misma muestra. (Fragmentos de 200, 99 y 62 pb) Recopilada de: Droplet Digital PCR Applications Guide QX200 Biorad.

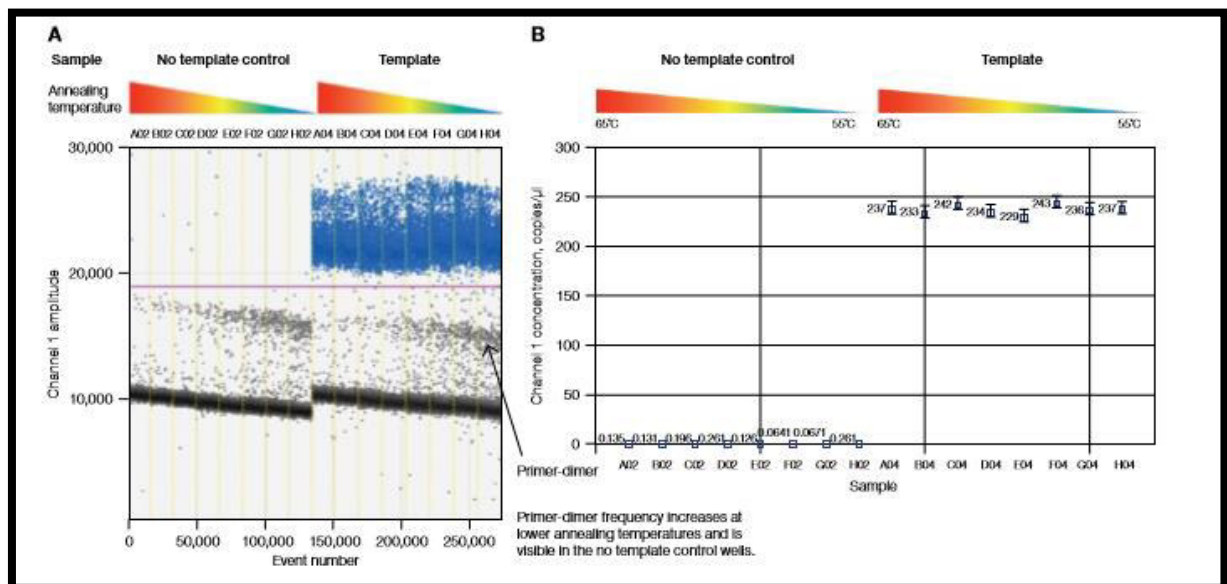
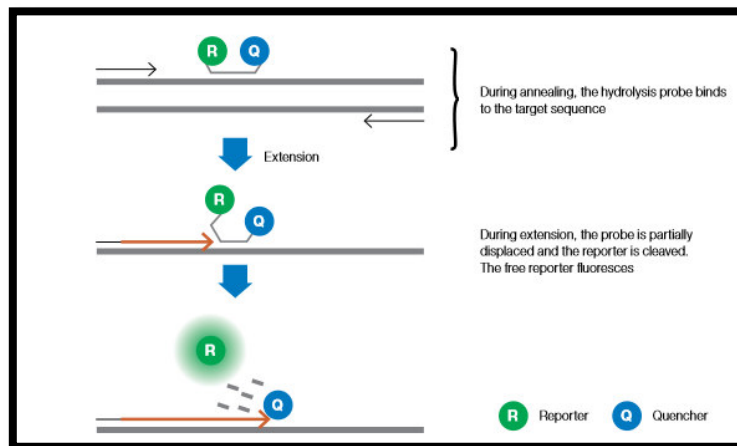


Figura 11. Interpretación de resultados Evagreen. El software del equipo realiza el ajuste del threshold permitiendo cuantificar aún en la presencia de dímeros de primers. Recopilada de: Droplet Digital PCR Applications Guide QX200 Biorad.

6.1.5 ddPCR: Modalidad de sondas Taqman

El equipo es compatible con la química de sondas Taqman, siendo capaz de detectar 2 canales de fluorescencia FAM y VIC (HEX) simultáneamente, facilitando el montaje de pruebas múltiplex (36) (Figura 12).

A)



B)

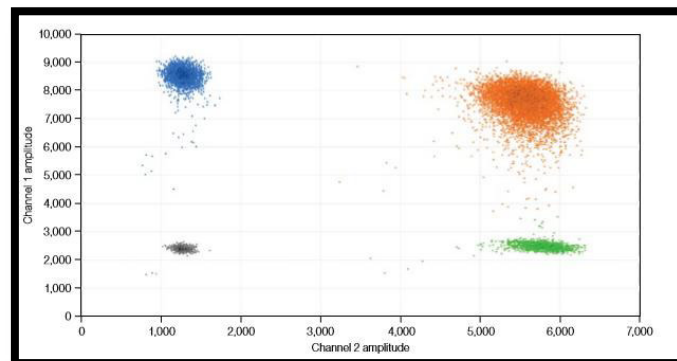


Figura 12 Fundamento de sondas Taqman. A) La sonda consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una región de la secuencia de interés unida a un fluoróforo reportero y a un quencher (apagador) que impide la emisión de fluorescencia, la sonda de hidrolisis se une a la secuencia de interés y durante el proceso de amplificación es escindida por la ADN polimerasa separando al quencher y al reportero que emite fluorescencia. B) El equipo detecta dos canales, siendo posible montar ensayos dúplex. Recopilada de: Droplet Digital PCR Applications Guide QX200 Biorad.

7. Antecedentes directos:

Nuestro equipo de investigación lleva una década de experiencia en el estudio del VPH y el CaCU colaborando con instituciones y universidades de los EUA, miembros del equipo de investigación colaboraron en un estudio de asociación de las variantes de VPH 16 con CaCU y las lesiones precursoras en mujeres mexicanas (47). Otro antecedente importante es la experiencia en el seguimiento de pacientes e identificación de factores de riesgo en la población del noreste de México que predisponen al CaCU. En un estudio realizado en el 2006 se dio seguimiento de 3 años (2002-2006) a 129 pacientes asintomáticas portadoras del VPH analizando la presencia del VPH y la aparición de lesiones epiteliales debidas al virus, y como hallazgos importantes se encontró que el 51 % de las mujeres presentaban una infección persistente y el 42 % de éstas desarrolló algún tipo de lesión; a su vez factores como la edad de la primera relación sexual, la edad del primer embarazo, el consumo de suplementos vitamínicos, las infecciones con VPHs de bajo riesgo oncogénico resultaron de riesgo para la persistencia de la infección del VPH (48).

La búsqueda de biomarcadores la hemos abordado también por medio de secuenciación del genoma del CaCU, la cual se concluyó en el 2013. El proyecto abarcó la secuenciación completa genómica de 14 muestras tumorales pareadas con su muestra normal y la secuenciación del exoma de 118 muestras tumorales pareadas. Se encontraron mutaciones recurrentes en genes previamente asociados a cáncer como ELF3, MAPK1 (7%), HLA-B (9%), EP300 (16%), FBXW7 (14%), CASP8 (5%) Y ERBB2 (5%). La detección de mutaciones sólo se realizó en muestras tumorales y actualmente se desconoce en qué estadio de la progresión del CaCU empiezan a generarse mutaciones conductoras (49). Por lo tanto es necesario identificar biomarcadores que sean de utilidad para la detección temprana, pronóstico y seguimiento del CaCU.

Actualmente la línea que estamos abordando es el estudio de miRNAs y lncRNAs como biomarcadores para la detección temprana, triage y pronóstico de las lesiones intraepiteliales cervicales y CaCU, integrándolo con el estudio de factores de riesgo que predisponen al CaCU, genotipificación y filogenia del VPH y estudios epidemiológicos, con el objetivo de aportar conocimientos y creación de recursos de valor que tengan una aplicación y beneficio para la población (Figura 13).

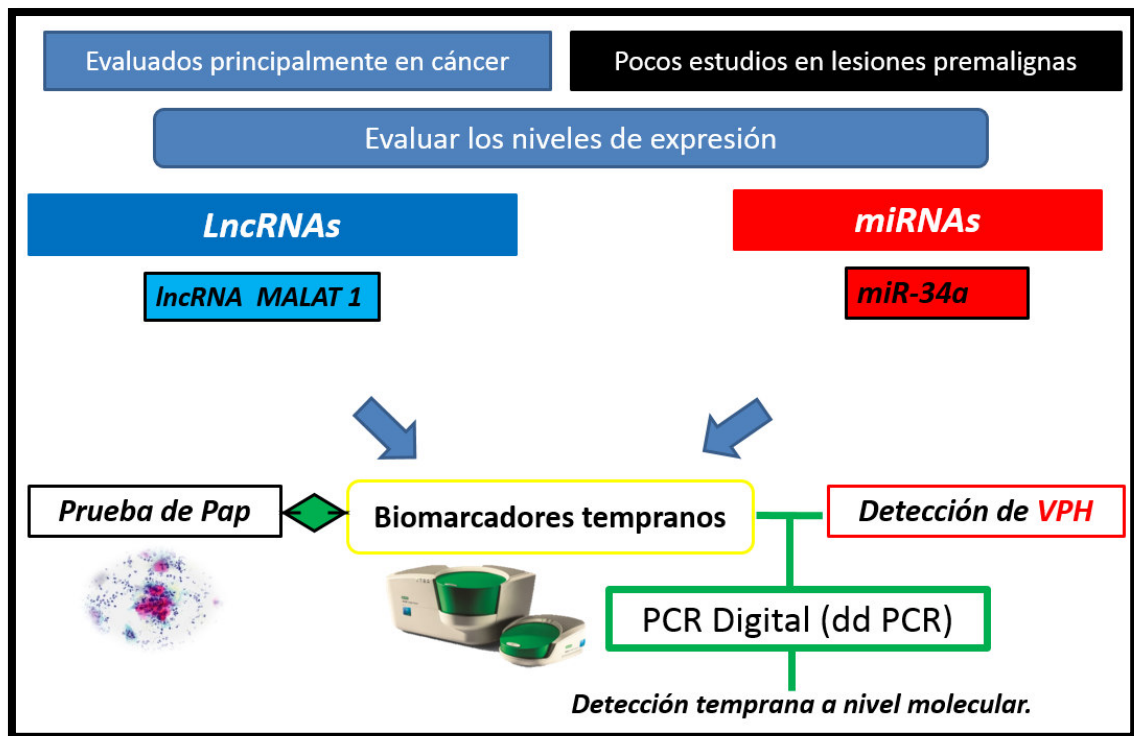


Figura 13 Propuesta. Se propone emplear la ddPCR para evaluar los niveles de expresión de los miRNAs, lncRNAs y detección de VPHs de alto riesgo en muestras de citología en base líquida, integrando los resultados con la citología convencional, con el objetivo de reforzar la sensibilidad y especificidad de la prueba y que sea de utilidad como triage para la detección temprana de las lesiones premalignas y CaCU.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el CaCU ocupa el 4º lugar de incidencia de cáncer en mujeres y en el país el 2º lugar de incidencia y mortalidad. El estándar de oro para la detección y seguimiento de CaCU ha sido desde 1943, la prueba de Pap la cual permite detectar las alteraciones morfológicas celulares en el cuello uterino. Con aproximadamente un 98 % de especificidad pero con una sensibilidad de tan solo el 51 %, el Pap posee una alta tasa de falsos negativos. Con respecto a la genotipificación de VPH esta posee una alta sensibilidad pero baja especificidad.

Debido a la necesidad de aumentar la sensibilidad y especificidad de los métodos actuales y buscar marcadores que nos brinden información sobre el riesgo a desarrollar CaCU, el uso de *biomarcadores tempranos* es un nuevo enfoque para mejorar el diagnóstico de las pacientes con lesiones premalignas.

Es importante implementar nuevas metodologías que faciliten la búsqueda de biomarcadores tempranos. Los reportes sobre miRNAs y lncRNAs en lesiones premalignas son escasos, por lo que evaluar miRNAs y lncRNAs en diferentes tipos de lesiones permitirá detectar oportunamente pacientes con riesgo a desarrollar CaCU.

La plataforma de ddPCR QX200 es altamente sensible y de menor costo que otras tecnologías utilizadas actualmente como la qPCR, lo cual permite mejorar las técnicas actuales para evaluar niveles de expresión de diferentes tipos de ARNs y la genotipificación del VPH.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

Los niveles de expresión del *lncRNA MALAT 1* y del *miR-34a* están asociados con el estatus del VPH (+/-) y el grado de lesiones precursoras del CaCU.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de expresión de *lncRNA MALAT 1* y *miRNA-34a* en muestras de citología en base líquida (CBL), analizando su posible aplicación como biomarcadores tempranos de lesiones premalignas y CaCU.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Seleccionar los grupos de estudio y explorar la cuantificación viral de VPH's de alto riesgo mediante ddPCR.
- 2.- Cuantificar los niveles de expresión del *lncRNA MALAT 1* en muestras de citología en base líquida (CBL).
- 3.- Cuantificar los niveles de expresión del *miR-34a* en muestras de citología en base líquida (CBL).

CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Estrategia general:

El proyecto fue aprobado ante el comité de ética con la clave BII-200, las muestras biológicas de CBL de casos y controles fueron recopiladas de pacientes que acuden a la consulta de colposcopia del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL (2012-2016). Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado de participación. Dichas muestras fueron transportadas al laboratorio para su conservación en congelación hasta su análisis y se ingresaron a una base de datos.

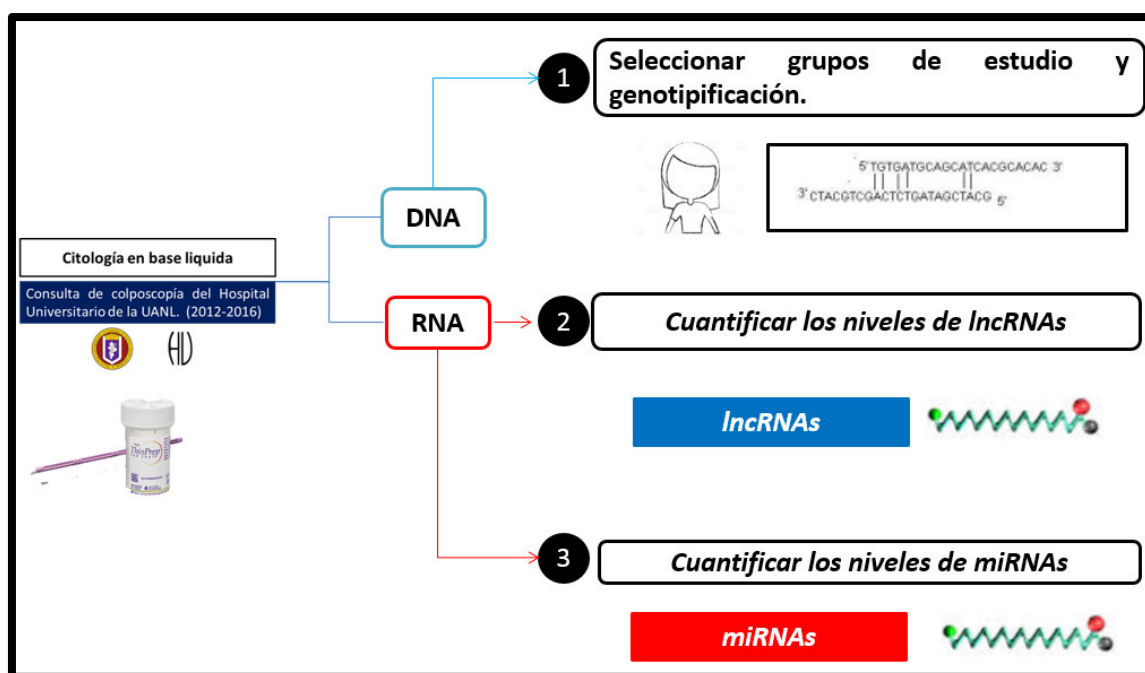


Figura 14. Estrategia general. La estrategia mediante la que abordamos este proyecto fue dividida en tres objetivos: 1) Seleccionar grupos de estudio a partir de la base de datos y genotipificación del VPH. 2) Cuantificar los niveles de lncRNA MALAT 1 en las muestras de CBL. 3) Cuantificar los niveles de miR-34a en las muestras de CBL.

A partir de la base de datos generada por la M.C Mariel Oyervides, se seleccionaron muestras que cumplieran con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

Casos

- ✓ Mayoría de edad

- ✓ VPH (+), sin coinfección con enfermedades de transmisión sexual.
- ✓ Sospecha de alteración en el Pap
- ✓ Noreste de México

Controles

- ✓ Mayoría de edad
- ✓ VPH (-), sin ETS.
- ✓ Sin alteración en Pap.
- ✓ Noreste de México

Criterios de exclusión

Casos y controles

- ✓ Mujeres embarazadas
- ✓ Sospecha de otras enfermedades de transmisión sexual.

Las pacientes que cumplieron con los criterios fueron 67. Se realizó la división en 4 grupos de estudio de acuerdo al grado de la lesión y estatus del VPH (+/-).

- 1.- Control: sin lesión - VPH negativas = 17
- 2.- Sin lesión –VPH positivas = 20
- 3.- Lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) = 14
- 4.- Lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) = 16

****Todas las muestras son clasificadas por un colposcopista y/o patólogo experto del HU y son conservadas en congelación hasta su análisis.***

Se realizó la extracción de ADN y ARN de muestras de CBL. Posteriormente se cuantificó el ADN y ARN, conservándose a -20 y -80 ° C respectivamente.

A partir del ADN se realizó la genotipificación viral (n=15) y el ARN fue retrotranscrito para evaluar los niveles de expresión de miRNAs (n=29) y lncRNAs (n=67), ambas pruebas se realizaron empleando el equipo QX200 ddPCR Biorad. Para la prueba de genotipificación viral fueron diseñados primers específicos para la detección de VPH de alto riesgo (16, 18,51), y la química empleada fue EvaGreen.

Para la evaluación de los niveles de expresión de miRNAs y lncRNAs se empleó la química de sondas Taqman prediseñadas, para cada una de las moléculas en estudio. El formato del método para el lncRNA MALAT 1 fue dúplex analizándose así la molécula de interés marcada con FAM y GAPDH, marcado con VIC, como control interno de amplificación. Con respecto al miR34a la sonda estaba marcada con FAM al igual que el RNU6b empleado como control de amplificación interno, estos se analizaron por separado. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Finalmente se procedió a analizar con pruebas estadísticas los resultados obtenidos, buscándose asociación entre el status del VPH (+/-), tipo de VPH, grado de la lesión y carga viral viéndose su posible aplicación como biomarcadores tempranos en CaCU.

2. Lugar de trabajo:

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática perteneciente al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL y en el Laboratorio Nacional Biobanco del CONACyT, en colaboración con el departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de la UANL.

3. Reactivos, materiales y equipos.

3.1 Reactivos.

Nombre	Características
Solución conservadora Thin Prep PreservCyt	946 ml Hologic
AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit	80224 50 prep. QIAGEN
AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	80234 50 prep. QIAGEN
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	4366596 ThermoFisher
SuperScript™ VILO™ Master Mix	11755050 250 RT QIAGEN
miR-34a Taqman Gene Expression Assays	-
RNU6b Taqman Gene Expression Assays	-
lncRNAs MALAT 1 Taqman Gene Expression Assays	-
GAPDH Taqman Gene Expression Assays	-
Primers custom: VPH 16, 18, 51.	Acceso Lab
ddPCRDroplet reader oil,	1863004 Biorad
ddPCR Droplet generation oil for probes	1863005 Biorad

ddPCR 2X Supermix for probes	1863026Biorad
ddPCR Buffer Control for Probes	1863052Biorad
ddPCR QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen	1864006Biorad
ddPCRQX200™ ddPCR™ EvaGreenSupermix	1864034Biorad
ddPCR QX200™ Buffer Control for EvaGreen	1864052Biorad

3.2 Material.

Nombre	Características
Cepillo para estudio citológico.	1631R2016 SSA Insumos para la salud
Tubos Eppendorf	Capacidad: 0.2,0.5,1.5 y 2 ml
Puntillas para micropipeta	Diferentes medidas
Tubos Falcon	Capacidad: 15 y 50 ml
Guantes de látex	Ambiderm
ddPCR Droplet generation cartridges and gaskets	1864007 Biorad
ddPCR Pierceable Foil Heat Seal	1814040 Biorad
ddPCR96-Well Plates	12001925 Biorad

3.3 Equipos.

Nombre	Lugar
QX200™ddPCR	Laboratorio Nacional Biobanco
Microcentrífuga	Genómica y Bioinformática
Termociclador Veriti 96 well	Laboratorio Nacional Biobanco
Thermomixer R	Genómica y Bioinformática
Nanodrop 2000 Thermo Fisher	Genómica y Bioinformática

4. Métodos.

4.1 Extracción de ADN, ARN y miRNAs.

La extracción de ADN, ARN y miRNAs, se realizó con el kit All Prep DNA/RNA/miRNA Universal siguiendo el protocolo reportado por el proveedor. El kit permite la purificación simultánea de ADN y ARN total, incluido miARNs, de la misma muestra de CBL.

El procedimiento es el siguiente:

- 1) Se centrifugaron las muestras de CBL durante 5 min a 300 G retirando el sobrenadante por aspiración.
- 2) Se agitó para desprender el pellet del tubo y se añadió 600 µl del Buffer RLT Plus/B-mercapto y se mezcló con la pipeta.
- 3) Se homogenizó el lisado con el Tissue Ruptor durante 30 s.
- 4) Se transfirió el lisado homogeneizado a una columna All Prep DNA Mini spin colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Y se centrifugó 30 s a 20,000 G.
- 5) Se colocó la columna All Prep DNA Mini spin en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se almacenó a 4 °C, para más adelante realizar la purificación de ADN.
- 6) El eluido se transfirió a un tubo de 2 ml para purificación de ARN.

4.1.1 Purificación de ARN (incluidos miRNAs).

- 1) Al eluido se agregó 50 µl de Proteinasa K y se mezcló pipeteando.
- 2) Se agregó 350 µl de etanol al 96 % y se mezcló pipeteando.
- 3) Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (digestión).
- 4) Se agregó 750 µl de etanol al 96 % y se mezcló pipeteando.
- 5) Se agregó 700 µl del eluido digerido, incluyendo cualquier precipitado a una columna RNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml y se centrifugó 15 s a 20,000 G. Se desechó el eluido de este paso.
- 6) Se repitió el paso 5 hasta que todo el eluido digerido haya pasado a través de la columna RNeasy Mini. Se desechó el eluido de este paso.
- 7) Se agregó 500 µl del buffer RPE a la columna RNeasy Mini. Y se centrifugó 15 s a 20,000 G. Se desechó el eluido de este paso.
- 8) Se agregó 10 µl de solución madre de ADNasa I a 70 µl del buffer RDD.
- 9) Se agregó la mezcla de incubación DNasa I (80 µl) directamente en la columna RNeasy Mini y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

10) Se agregó 500 µl del Buffer FRN a la columna RNeasy Mini. Y se centrifugó durante 15 s a 20,000 G. El eluido se utilizó en el siguiente paso.

11) Se colocó la columna RNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Se transfirió el eluido del paso anterior a la columna y se centrifugó 15 s a 20,000 G. Se desechó el eluido de este paso.

12) Se agregó 500 µl del buffer RPE a la columna RNeasy Mini y se centrifugó durante 15 s a 20,000 G. Se desechó el eluido de este paso. Se reutilizará el tubo de recolección en el paso siguiente.

13) Se agregó 500 µl de etanol al 96 % a la columna RNeasy Mini y se cerró la y se centrifugó durante 2 minutos a 20000 G para lavar la membrana de la columna.

Se retiró con cuidado la columna RNeasy Mini del tubo de recolección.

14) Se colocó la columna RNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml. Se agregó 50 µl de agua libre de nucleasas directamente a la columna y se centrifugó durante 1 min a 8000 G para eluir el ARN.

15) Almacenar el ARN a – 80 °C hasta su análisis.

4.1.2 Purificación de ADN genómico.

1) Se agregó 350 µl del Buffer AW1 a la columna All Prep DNA Mini inicial. Y se centrifugó durante 15 s a 20,000 G para lavar la membrana de la columna. Se desechó el eluido de este paso.

2) Se agregó 20 µl de proteinasa K a 60 µl del buffer AW1, se mezcló pipeteando y se aplicó la mezcla a la membrana de la columna All Prep DNA Mini.

3) Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.

4) Se agregó 350 µl del Buffer AW1 a la columna All Prep DNA Mini. Y se centrifugó durante 15 s a 20,000 G para lavar la membrana de la columna. Se desechó el eluido de este paso. Se reutilizó el tubo de recolección en el paso siguiente.

5) Se agregó 500 µl del Buffer AW2 a la columna All Prep DNA Mini y se centrifugó durante 2 min a 20,000 G.

6) Se colocó la columna All Prep DNA Mini en un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml. Se agregó 100 µl del Buffer EB directamente a la membrana de la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 G para eluir el ADN.

7) Se almacenó el ADN a -20 °C hasta su análisis.

4.2 Diseño de la prueba de genotipificación viral mediante ddPCR.

Se procedió a diseñar los primers para VPHs de alto riesgo: 16, 18 y 51 con las siguientes herramientas: Base de datos PaVE, Primer Blast NCBI , Oligocalc y Oligoanalyzer de IDT.

Se siguieron las siguientes recomendaciones para el diseño:

- Porcentaje de GC 50-60 %
- Temperatura de alineamiento entre 50 a 65 °C.
- Evitar la formación de estructuras secundarias y complementariedad en extremo 3'.
- Evitar repeticiones de G o C mayores a 3 bases.
- Incluir G o C en el extremo 3' cuando sea posible.

4.3 Digestión ADN genómico previo a ddPCR.

Se realizó la digestión de 250 ng de muestra de ADN genómico en 25 µl de reacción empleando la enzima EcoRI HF/ Buffer Cutsmart 2 h a 37 °C. Esta digestión se evidenció con un patrón de “barrido” en gel de agarosa al 1 % correspondiente al ADN genómico digerido. A su vez en los gráficos de amplitud de ddPCR, correspondientes a la detección de los VPH's, se observó la disminución del ruido de fondo.

4.4. Genotipificación viral mediante ddPCR.

1.-Se descongelaron todos los componentes a temperatura ambiente. Se mezcló completamente agitando en vórtex, ya que se puede formar un gradiente de concentración durante el almacenamiento a -20 °C.

* Se centrifugó brevemente para que el contenido se vaya al fondo del tubo.

2.-Se descongeló el producto de digestión del ADN genómico y se homogenizó durante 5 min a 4 °C.

3.-Se preparó la mezcla de reacción para el número de reacciones necesarias de acuerdo con las condiciones descritas en la tabla 2. Se colocó todos los componentes requeridos excepto la muestra, se repartieron alícuotas iguales en cada tubo de reacción y se agregó 5 ul de muestra a cada tubo.

Tabla 2 Condiciones de reacción ddPCR con la química de Evagreen.

Componente	Volumen por reacción (ul)	Concentración final
QX200 Supermix ddPCR Evagreen	10	1x
Primer Forward (4uM)	1	200 nm
Primer Reverse (4uM)	1	200 nm
Agua libre de nucleasas	3	-
Muestra (producto de digestión)	5	-
Volumen Total	20	-

4.-Se mezcló completamente agitando en vórtex. Se centrifugó brevemente para asegurarse de que todos los componentes estén en la parte inferior del tubo de reacción. Se permitió que los tubos de reacción se atemperen durante aproximadamente 3 min.

5.-Una vez que las mezclas de reacción estuvieron listas, se cargó 20 µl de cada mezcla de reacción en un pocillo de muestra de un cartucho DG8™. QX200 Droplet Generator seguido de 70 µl del aceite generadora de gotas EvaGreen en los pozos indicados para el aceite. Se generaron las gotas en el equipo generador automatizado.

6.-Después de la generación de gotas, se transfirió cuidadosamente las gotas a una placa de 96 pocillos y se selló la placa con el sellador de placas PCR PX1.

7.-Se procedió con el ciclo térmico (Tabla 3) y la posterior lectura de gotas en el lector de gotas QX200.

Tabla 3 Condiciones de la etapa de amplificación de ddPCR con la química de Evagreen.

Paso del ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Rango	Número de ciclos
Activación de la enzima	95	10 min	2 ° C /seg	1
Desnaturalización	94	30 sec		40
Alineación/Extensión	58	1 min		40
Desactivación de la enzima	98	10 min		1
Conservación (opcional)	4	Infinito		1

8.- Después del ciclo térmico, se colocó la placa sellada de 96 pocillos en el lector de gotas QX200.

9.- Se configuró el diseño de la placa utilizando el software Quanta Soft.

10.- La concentración se obtuvo expresada en número de copias / μL de la reacción 1x ddPCR final.

4.5 Retrotranscripción.

Para esto se empleó el kit SuperScript™ VILO™ MasterMix.

1. Para una sola reacción se mezclaron los siguientes componentes en un tubo de PCR estéril o placa en hielo.

Tabla 4 Condiciones de reacción de retrotranscripción.

Componente	Volumen
SuperScript™ VILO™ MasterMix	4 μL
ARN (hasta 2.5 μg)	X μL
Agua tratada con DEPC	Hasta 20 μL

Nota: La capacidad máxima de este kit es de 2.5 μg de ARN total, en este proyecto se retrotranscribieron de 250 ng de ARN total.

2. Se mezcló suavemente e incubó a 25 °C durante 10 min.

3. Se incubó a 42 °C durante 60 minutos.

4. Se terminó la reacción a 85 °C a los 5 min.

5. Se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Finalmente se cuantificó el ADN complementario obtenido y se realizaron diluciones de 12 ng/ μL en agua libre de nucleasas para su posterior análisis en la ddPCR.

4.6 Evaluación de los niveles de expresión de miRNAs y lncRNAs.

1. Se descongelaron todos los componentes a temperatura ambiente. Se mezcló completamente agitando en vórtex, ya que se puede formar un gradiente de concentración durante el almacenamiento a -20 ° C.

* Se centrifugó brevemente para que el contenido se vaya al fondo del tubo.

2. Se procedió a descongelar y homogenizar la muestras en el Thermomixer durante 5 min a 4 °C.

3. Se prepararon la mezcla de reacción para el número de reacciones necesarias de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 5. Se colocaron todos los componentes requeridos excepto la muestra, se repartieron alícuotas iguales en cada tubo de reacción y se agregó 4 ul de muestra a cada tubo de reacción como paso final.

Tabla 5 Condiciones de reacción ddPCR con la química de sondas Taqman.

Componente	Volumen por reacción (ul)	Concentración final
QX200 Supermix ddPCR para sondas	10	1x
20 x primers/sonda (FAM)	1	900 nM/250 nM
20 x primers/sonda (VIC)	1	900 nM/250 nM
Agua libre de nucleasas	4	-
Muestra	4	-
Volumen Total	20	-

4.- Se mezcló completamente agitando en vórtex. Se centrifugó brevemente para asegurarse de que todos los componentes estén en la parte inferior del tubo de reacción.

5.- Una vez que las mezclas de reacción estuvieron listas, se cargó 20 µl de cada mezcla de reacción en un pocillo de muestra en un cartucho DG8™ QX200 Droplet Generator seguido de 70 µl de aceite para la generación de gotas en los pozos marcados para el aceite. Finalmente se generaron las gotas en el equipo generador automatizado de gotas.

6.-Después de la generación de gotas con el generador de gotas QX200, se transfirió cuidadosamente las gotas a una placa de 96 pocillos y se selló la placa con el sellador de placas PCR PX1.

7.-Se procedió con el ciclo térmico (tabla 6) y la posterior lectura de gotas en el lector QX200.

Tabla 6 Condiciones de la etapa de amplificación de ddPCR con la química de sondas Taqman.

Paso del ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Rango	Número de ciclos
Activación de la enzima	95	10 min	2 ° C /seg	1
Desnaturalización	94	30 sec		40
Alineación/Extensión	60	1 min		40
Desactivación de la enzima	98	10 min		1
Conservación (opcional)	4	Infinito		1

8.- Después del ciclo térmico, se colocó la placa sellada de 96 pocillos en el lector de gotas QX200.

9.- Se configuró el diseño de la placa utilizando el software Quanta Soft.

10.- La concentración se obtuvo expresada en número de copias / µl de la reacción 1x ddPCR final.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos, los cuales se dividirán de acuerdo a los objetivos:

1.- Seleccionar los grupos de estudio y explorar la cuantificación viral de VPH's de alto riesgo mediante ddPCR.

Se realizó la extracción de ADN y ARN de 67 muestras de CBL que cumplieron con los criterios de inclusión, obteniéndose todas las muestras con buena calidad con una adecuada relación 260/280.

a) Diseño y optimización de la prueba de detección y cuantificación de VPH de alto riesgo.

Se logró el diseño de primers para la detección y cuantificación de VPH 16, 18, 51 y beta globina, lo cuales fueron probados y optimizados para ddPCR (Tabla 7). Primeramente se procedió a realizar la estandarización para determinar las condiciones óptimas de reacción. Las únicas variables que fue necesario optimizar fueron la temperatura de alineamiento (Tm) y un paso de digestión previa a la reacción de ddPCR.

Tabla 7 Primers diseñados para la detección y cuantificación de VPH de alto riesgo. Se presentan los 4 pares de primers diseñados, su temperatura de alineamiento calculada in silico con la herramienta oligocalc y el tamaño del fragmento amplificado.

Target	Primers (5' a 3')	Tm	Amplicón
16	F GGNNCAATGNNNNNTAATGAGC	58.2	167 pb
	R GCTGNNNNNNCTGCTAATNNNN	57.2	
18	F NNNNCGT TTC CTG NNNNN	57.3	82 pb
	R CAGTATGNNNNNNGGCGN	57.4	
51	F NNNNNNAAC GAC AGC NNN	57.6	119 pb
	R NNNNCCTCCAGTGTTAGTNNN	56.6	
Beta globina	F NNNNNNTTC ATC CAC GTT NNNNN	57.7	248 pb
	R NNNNNNTCA CTT AGA CCT NNNNN	57.2	
GAPDH	F NNNNNTGTCCTCCTAGNNNN	61.8	191 pb
	R NNNNNNTCCTCCTAGNNNN	61.9	

Se realizaron varios ensayos combinando diferentes tiempos del paso de digestión previo a la ddPCR y de gradiente de temperatura de alineamiento en la etapa de amplificación de la ddPCR. Se obtuvieron los mejores resultados digiriendo 250 ng de muestra de ADN genómico en 25 μ l de reacción empleando la enzima EcoRI HF durante 2 h a 37 °C y utilizando una T_m de 58 °C. Se eligieron estas condiciones debido a que se observaron clusters de gotas negativas y positivas diferenciados, sin efecto lluvia, lo cual nos garantiza una resolución adecuada (Figura 15).

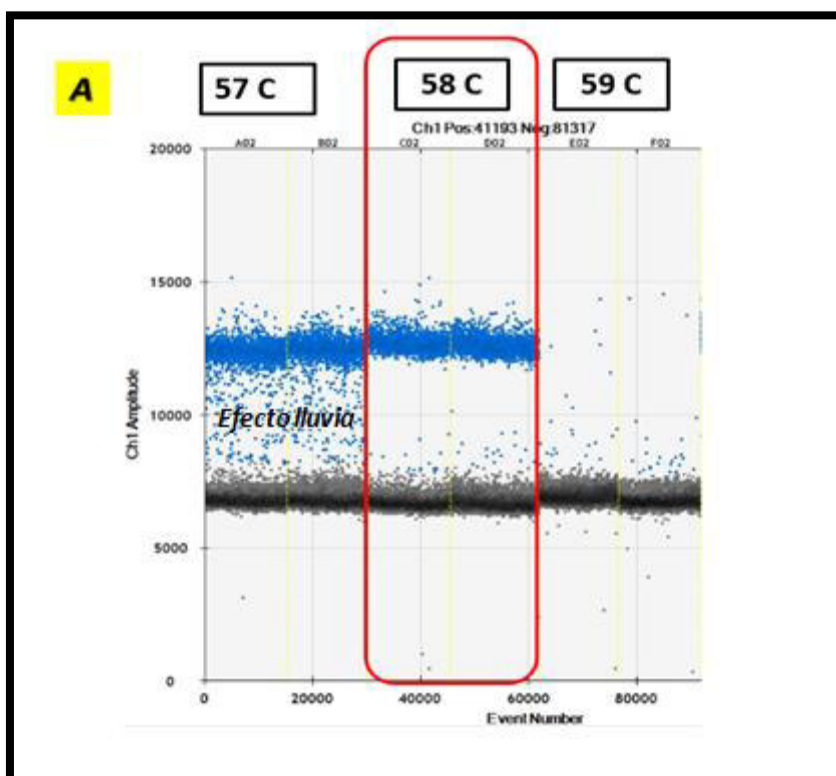


Figura 15. Optimización de la T_m para la detección y cuantificación de VPH mediante ddPCR. Se observa que a 57°C hay amplificación debido a la detección de gotas positivas y negativas, sin embargo se presenta el efecto lluvia, lo cual no permite realizar una cuantificación adecuada. A 59°C no hay amplificación, por lo tanto se eligió la temperatura de 58°C, porque presenta características ideales para la detección y cuantificación: Hay clusters de gotas negativas y positivas diferenciados y no se presenta el efecto lluvia.

Ya establecidas las condiciones de digestión y T_m , se obtuvieron gráficos característicos adecuados para la cuantificación (Figura 16).

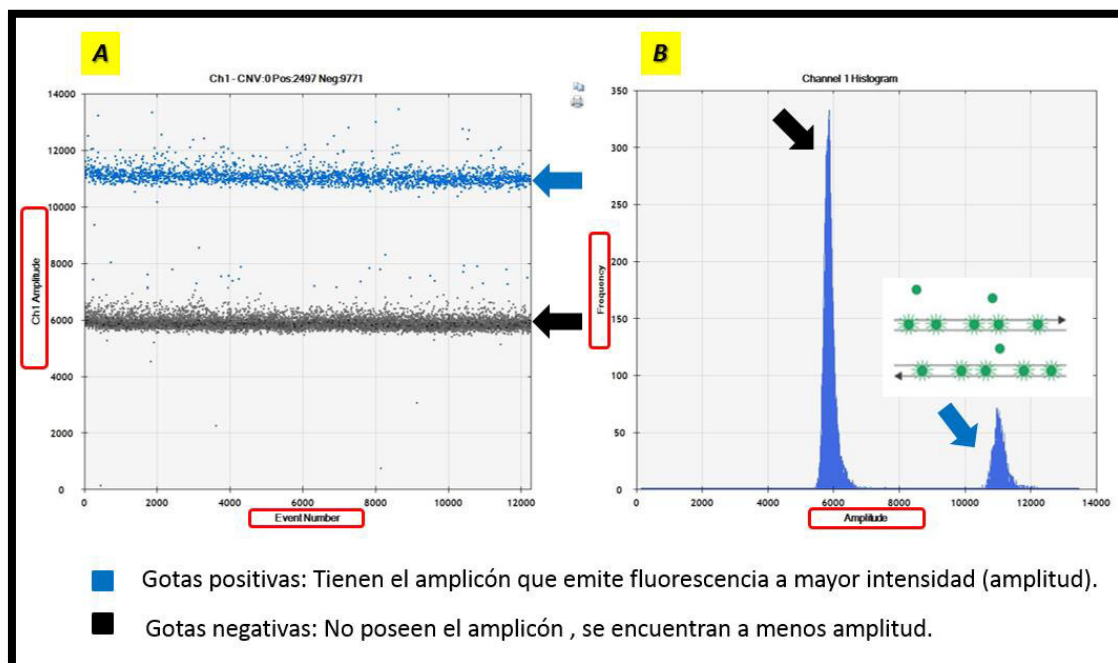


Figura 16. Gráficos de amplitud e histograma de señal característicos para VPH 16 A) Gráfico de amplitud de señal. Se observan clusters de gotas negativas y positivas diferenciados y sin efecto lluvia, a su vez se detectan más de 10,000 eventos, siendo estas las características ideales para la detección y cuantificación. B) Histograma de señal. Se observan únicamente 2 bandas correspondientes una al clúster de gotas negativas (~ 6000) y otro al clúster de gotas positivas (~11,000), esto nos indica que no hay formación de dímeros de primers o la generación de fragmentos adicionales. **Flechas: Azul:** Clúster de gotas positivas, **Negro:** Clúster de gotas negativas.

Se obtuvieron gráficos ideales para la detección y cuantificación de VPH 16, 18, 51 y controles de amplificación de beta globina y GAPDH. A continuación se presentan gráficos representativos de cada uno (Figuras 17-20).

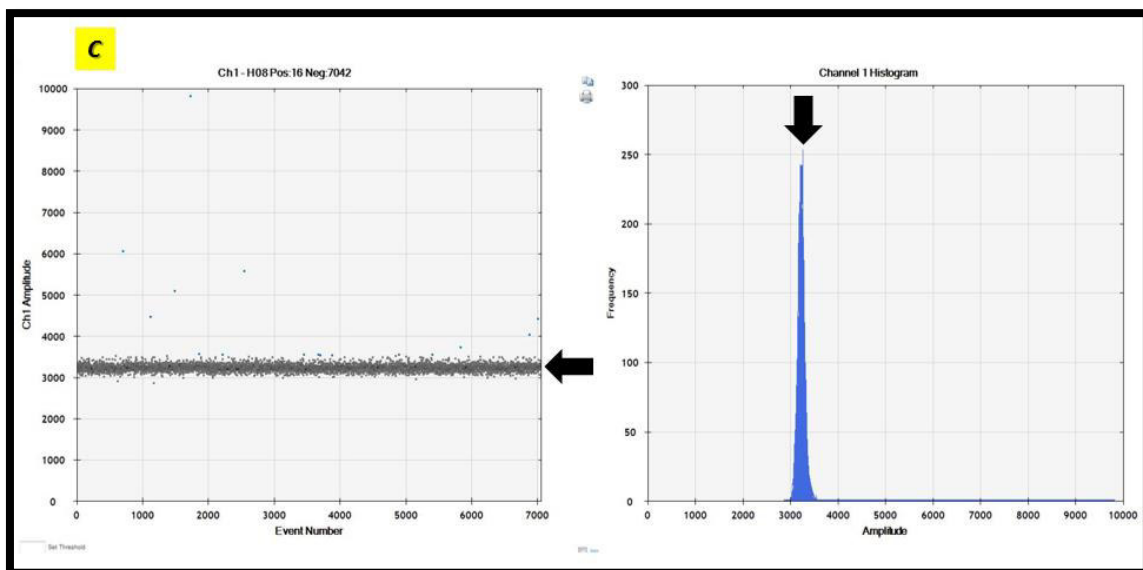
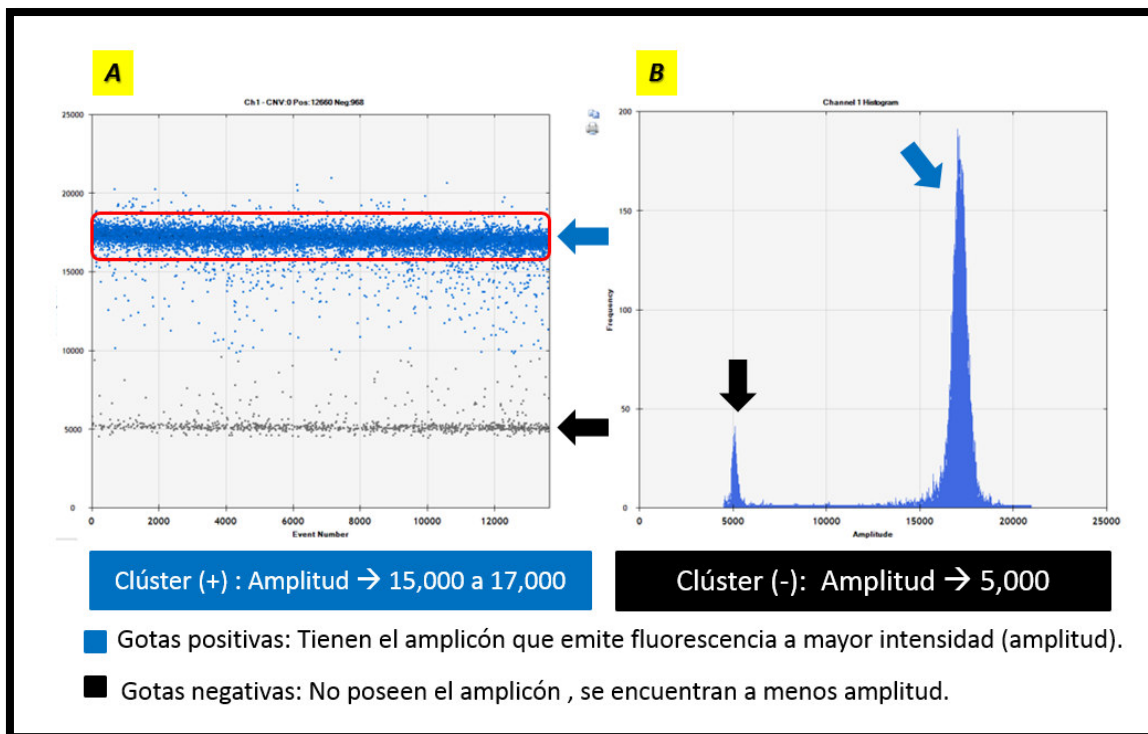


Figura 17. Gráfico e histograma de amplitud de señal para la detección y cuantificación de VPH 16. A) Gráfico de amplitud de señal. Se observan clusters de gotas negativas y positivas diferenciados y sin efectos lluvia. B) Histograma de señal. Se observan únicamente 2 bandas correspondientes una al clúster de gotas negativas (~ 5,000) y otro al clúster de gotas positivas (15,000 a 17,000), esto nos indica que no hay formación de dímeros de primers o la generación de fragmentos adicionales. C) Gráfico de amplitud de señal de una muestra negativa para VPH 16. En el gráfico de amplitud de señal e histograma de señal se observa únicamente un clúster que corresponde a gotas negativas **Flechas: Azul:** Clúster de gotas positivas, **Negro:** Clúster de gotas negativas.

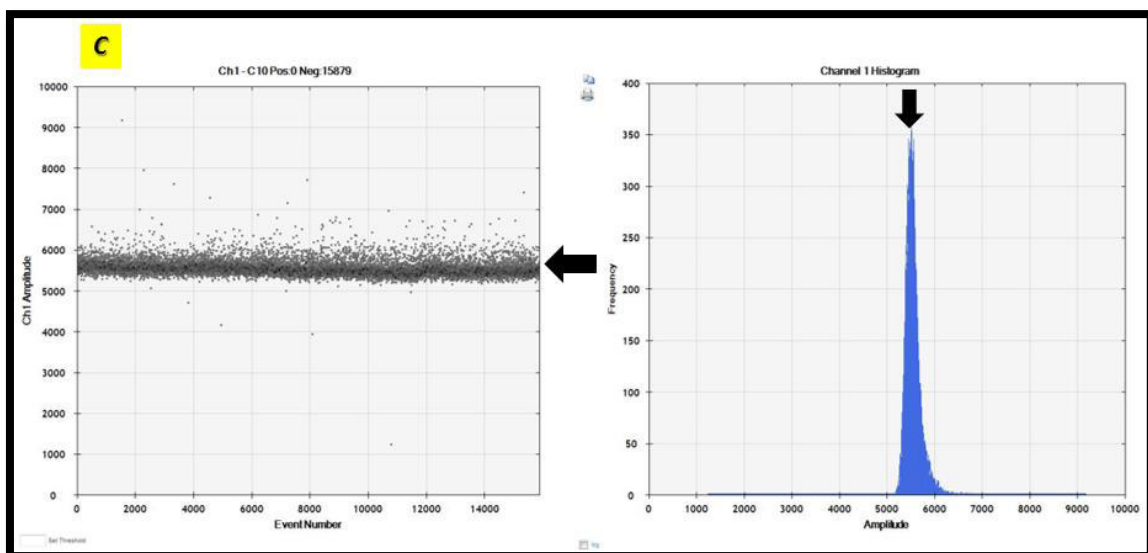
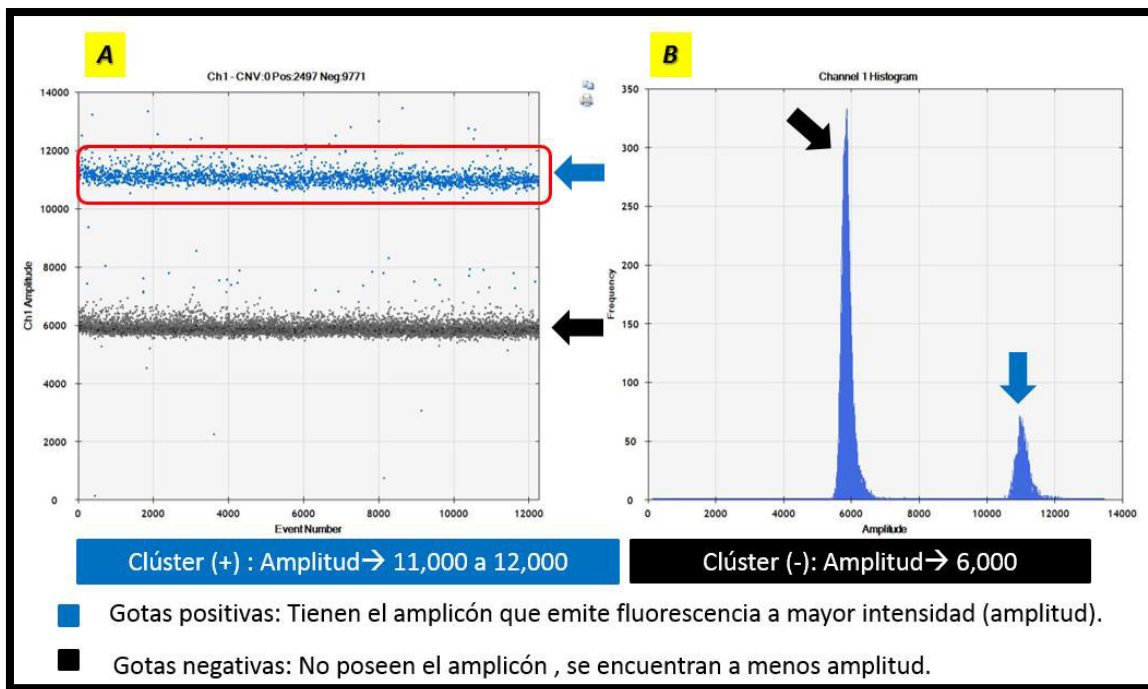


Figura 18. Gráfico e histograma de amplitud de señal para la detección y cuantificación de VPH 18. A) Gráfico de amplitud de señal. Se observan clusters de gotas negativas y positivas diferenciados y sin efectos lluvia. B) Histograma de señal. Se observan únicamente 2 bandas correspondientes una al clúster de gotas negativas (~ 6,000) y otro al clúster de gotas positivas (11,000 a 12,000), esto nos indica que no hay formación de dímeros de primers o la generación de fragmentos adicionales. C) Gráfico de amplitud de señal e histograma de señal de una muestra negativa para VPH 18. En el gráfico de amplitud de señal e histograma de señal se observa únicamente un clúster que corresponde a gotas negativas **Flechas: Azul:** Clúster de gotas positivas, **Negro:** Clúster de gotas negativas.

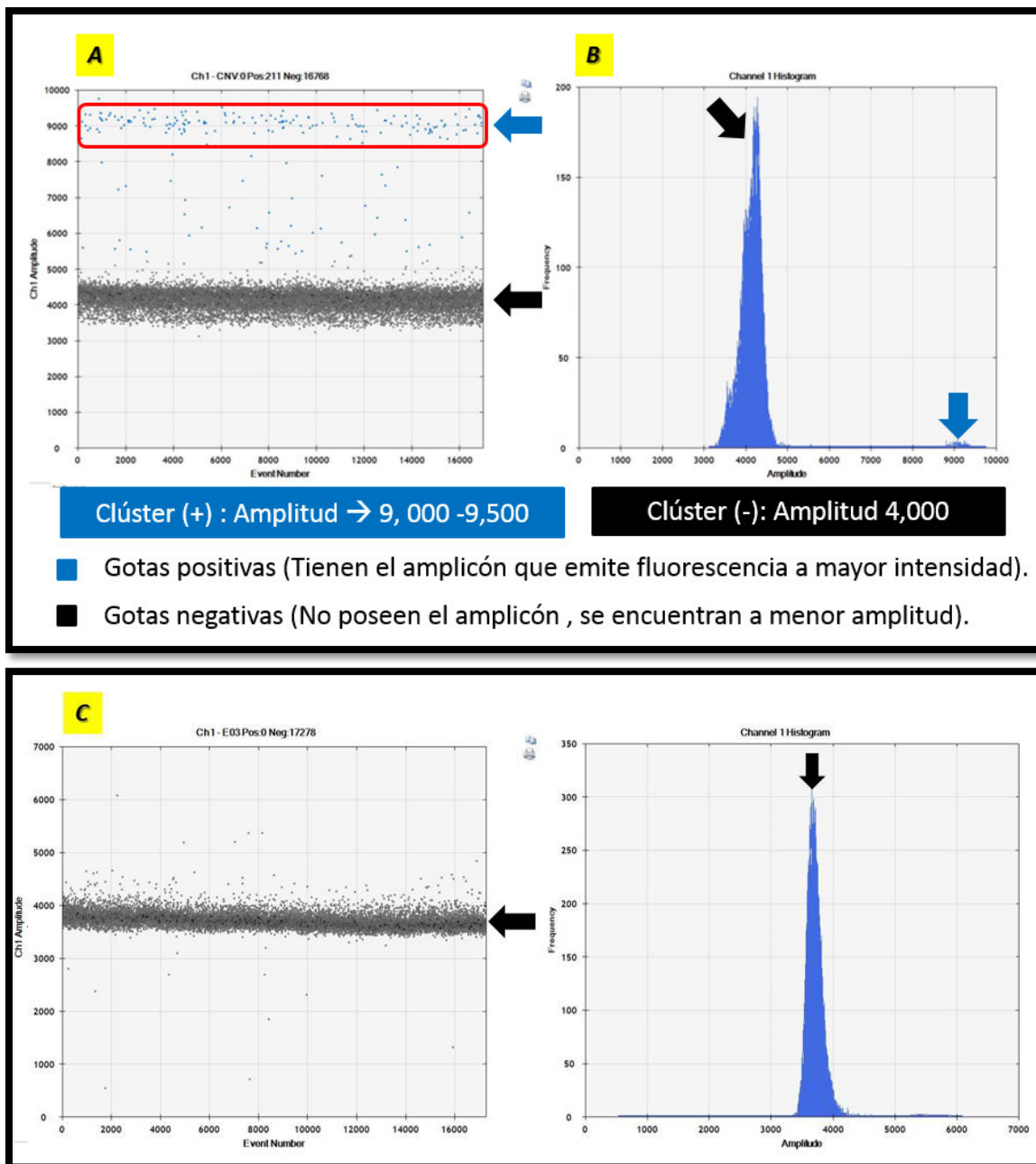


Figura 19. Gráfico e histograma de amplitud de señal para la detección y cuantificación de VPH 51. A) Gráfico de amplitud de señal. Se observan clusters de gotas negativas y positivas diferenciados y sin efectos lluvia. B) Histograma de señal. Se observan únicamente 2 bandas correspondientes una al clúster de gotas negativas (~ 4,000) y otro al clúster de gotas positivas (9,000 a 9,500), esto nos indica que no hay formación de dímeros de primers o la generación de fragmentos adicionales. C) Gráfico de amplitud de señal de una muestra negativa para VPH 51. En el gráfico de amplitud de señal e histograma de señal se observa únicamente un clúster que corresponde a gotas. **Flechas: Azul:** Clúster de gotas positivas, **Negro:** Clúster de gotas negativas.

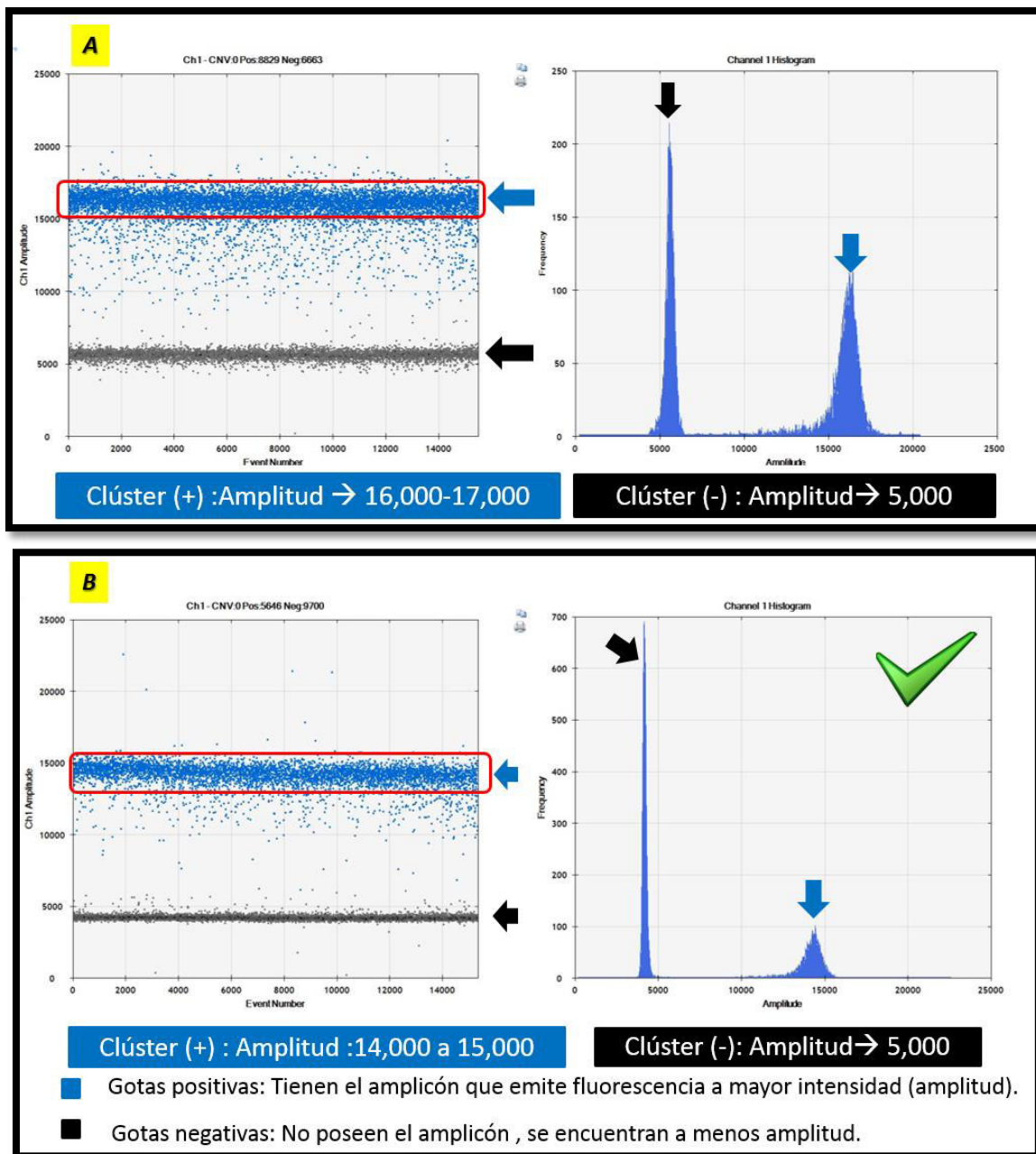


Figura 20. Gráfico e histograma de amplitud de señal de controles de amplificación (beta globina y GAPDH). A) Gráfico de amplitud de señal de beta globina. Se observan clusters de gotas negativas y positivas diferenciados y sin efectos lluvia. Y en el histograma de señal se observan únicamente 2 bandas correspondientes una al clúster de gotas negativas (~ 5,000) y otro al clúster de gotas positivas (16,000 a 17,000), esto nos indica que no hay formación de dímeros de primers o la generación de fragmentos adicionales. B) Gráfico de amplitud de señal de GAPDH. Se observan clusters de gotas negativas y positivas diferenciados y sin efectos lluvia. Y en el histograma de señal se observan únicamente 2 bandas correspondientes una al clúster de gotas negativas (~ 5,000) y otro al clúster de gotas positivas (14,000 a 15,000), esto nos indica que no hay formación de dímeros de primers o la generación de fragmentos adicionales, se decidió utilizar GAPDH como control interno, debido a presentó mejor resolución entre gotas negativas y positivas. **Flechas: Azul:** Clúster de gotas positivas, **Negro:** Clúster de gotas negativas.

Ya optimizado se procedió a realizar la detección y cuantificación de VPH 16 y 18 en muestras de CBL con reporte previo de positividad para VPH 16 o 18 según corresponda.

En cuanto a las amplitudes de señal de los fragmentos amplificados para la detección de VPH 16,18, 51, beta globina y GAPDH, se observaron amplitudes del clúster de gotas positivas y negativas diferentes entre algunos tipos de VPH y controles internos, esto nos indica que podría ser posible emplearlos para realizar la detección y cuantificación en un diseño multiplex. (Tabla 8)

Tabla 8 Amplitudes de señal de los fragmentos amplificados para la detección de VPH 16,18, 51, beta globina y GAPDH. Se observa que algunos fragmentos amplificados para la detección del VPH y los controles internos poseen una amplitud de señal de fluorescencia diferente.

Target	Amplicón	Amplitud de Clúster positivo	Amplitud de Clúster negativo
VPH 16	167 pb	15,000 – 17,000	5,000
VPH 18	82 pb	11,000-12,000	6,000
VPH 51	119 pb	9,000- 9500	4,000
Beta globina	248 pb	16,000 – 17,000	5,000
GAPDH	191 pb	14,000 -15,000	5,000

1.1 Detección y cuantificación de VPH 16

Se realizó la detección y cuantificación del VPH 16 en cinco muestras que habían mostrado positividad previa a VPH 16 mediante qPCR. Mediante ddPCR los resultados que obtuvimos son el número de copias de VPH 16 por microlitro y número de copias de GAPDH por microlitro (Tabla 9), y a partir de estos dos valores se determinó el número de copias de VPH 16 por célula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{VPH 16 Copias por ul}}{\text{GAPDH Copias por ul} / 2} = \text{No. copias VPH 16 por célula}$$

Tabla 9 Detección y cuantificación de VPH 16. Se presentan los resultados obtenidos del número de copias de VPH 16 por célula mediante qPCR y ddPCR. Cuantificándose mediante ddPCR de 0.2 a 11.3 copias de VPH 16 por célula.

Muestra	VPH 16 Copias/ul	(GAPDH copias/ul) / 2	ddPCR VPH 16 No. copias /cel	qPCR Carga total HPV/ 10 ⁴ 5 cells	qPCR No. Copias /cel
83	55,15	237,5	0,2	Menos de 1000 copias	0,01
183	263,5	220	1,2	5,57	3,71
192	320,5	214	1,5	5,35	2,23
95	1563,5	270	5,8	6,02	10
52	2830	250	11,3	6,28	19

Posteriormente se determinó el cociente o relación del número de copias por célula de VPH 16 obtenido mediante qPCR y ddPCR (Tabla 10). Se obtuvieron cocientes qPCR/ddPCR de 0.1 hasta 3.1, esto nos permite determinar la similitud que existe entre ambas metodologías.

Tabla 10 Cociente o relación del No. de copias de VPH 16 por célula obtenido mediante qPCR y ddPCR. Se presentan los resultados obtenidos del cociente o relación del No. de copias de VPH 16 por célula mediante qPCR y ddPCR. Obteniéndose cocientes que van desde 0.1 hasta 3.1.

Muestra	VPH 16 Copias/ul	(GAPDH copias/ul) / 2	ddPCR VPH 16 No. copias /cel	qPCR Carga total HPV/ 10 ⁵ cells	qPCR No. Copias /cel
83	55,15	237,5	0,2	Menos de 1000 copias	0,01
183	263,5	220	1,2	5,57	3,71
192	320,5	214	1,5	5,35	2,23
95	1563,5	270	5,8	6,02	10
52	2830	250	11,3	6,28	19

A su vez construimos una curva de correlación del No. de copias por célula de VPH 16 obtenido por qPCR y los resultados obtenidos mediante ddPCR (Figura 21). Encontrándose de manera muy interesante que existe una relación lineal positiva entre ambas metodologías.

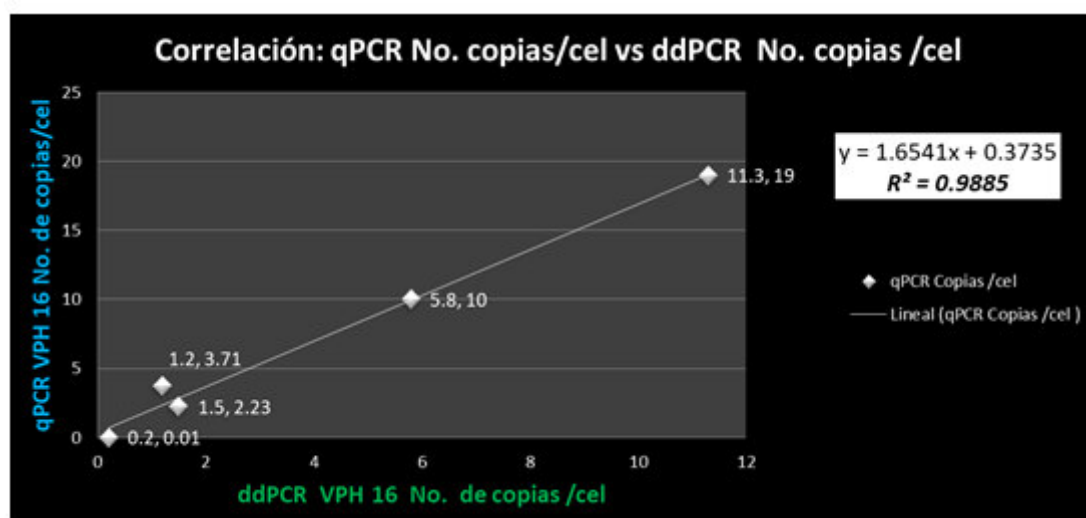


Figura 21. Gráfico de correlación del número de copias por célula de VPH 16 qPCR y los resultados obtenidos mediante ddPCR. Se observa que existe una relación lineal positiva entre los resultados obtenidos por ambas metodologías.

1.2 Detección y cuantificación de VPH 18

Se realizó la detección y cuantificación del VPH 18 en tres muestras que habían mostrado positividad previa a VPH 18 mediante qPCR. Mediante ddPCR los resultados que obtuvimos son el No. de copias de VPH 18 por microlitro y No. de copias de GAPDH

por microlitro (Tabla 11), y a partir de estos dos valores se determinó el número de copias de VPH 18 por célula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{VPH\ 18\ Copias\ por\ ul}{GAPDH\ Copias\ por\ ul / 2} = No. copias\ VPH\ 18\ por\ célula$$

Tabla 11 Detección y cuantificación de VPH 18. Se presentan los resultados obtenidos del número de copias de VPH 16 por célula mediante qPCR y ddPCR. Cuantificándose mediante ddPCR de 1.1 a 38.7 copias de VPH 18 por célula.

Muestra	Tipos de VPH	ddPCR VPH 18 No. Copias/ul	GAPDH copias /ul / 2	ddPCR VPH 18 Número de copias /cel	Carga total Ig HPV/ 10 ⁵ cells	qPCR VPH 18 No. Copias/ cel
95	16,18,59, 66	301	273	1.1	4.82	0.6
228	18	333	251.5	1.3	3.51	0.03
288	18,58	8850	229	38.7	6.54	34

Posteriormente al igual que en al caso del VPH 16 se determinó el cociente o relación del número de copias por célula de VPH 18 obtenido mediante qPCR y ddPCR (Tabla 12). Se obtuvieron cocientes qPCR /ddPCR de 0.02 a 0.9, esto nos permite determinar la similitud que existe entre ambas metodologías.

Tabla 12 Cociente o relación del No. de copias de VPH 18 por célula obtenido mediante qPCR y ddPCR. Se presentan los resultados obtenidos del cociente o relación del No. de copias de VPH 18 por célula mediante qPCR y ddPCR. Obteniéndose cocientes que van desde 0.02 hasta 0.9.

Muestras	ddPCR VPH 18 No. copias /cel	qPCR No. VPH 18 No. Copias/ cel qPCR	qPCR /ddPCR
95	1,1	0,6	0,5
228	1,3	0,03	0,02
288	38,7	34	0,9

2.- Cuantificar los niveles de expresión del lncRNA MALAT 1 en muestras de citología en base líquida (CBL) mediante ddPCR.

En este objetivo a partir del ARN extraído de las muestras de CBL, se realizó la retrotranscripción para la obtención del ADN complementario (ADNc) y realizar la cuantificación del lncRNA MALAT 1.

2.1 Optimización de la cuantificación de MALAT 1 y GAPDH mediante ddPCR.

Primeramente determinamos la cantidad de ADNc óptima para realizar la cuantificación del lncRNA MALAT 1 y GAPDH como control de amplificación, para esto montamos la reacción de ddPCR analizando diluciones por duplicado de una muestra, colocando desde 12 a 96 ng de ADNc por reacción de 20 μ l. (Figura 22). Se destaca que es posible cuantificar en este rango de concentración de ADN complementario, es posible determinar MALAT1 y GAPDH simultáneamente en la CBL y cuantificar a una baja concentración de ADNc (12 ng por reacción).

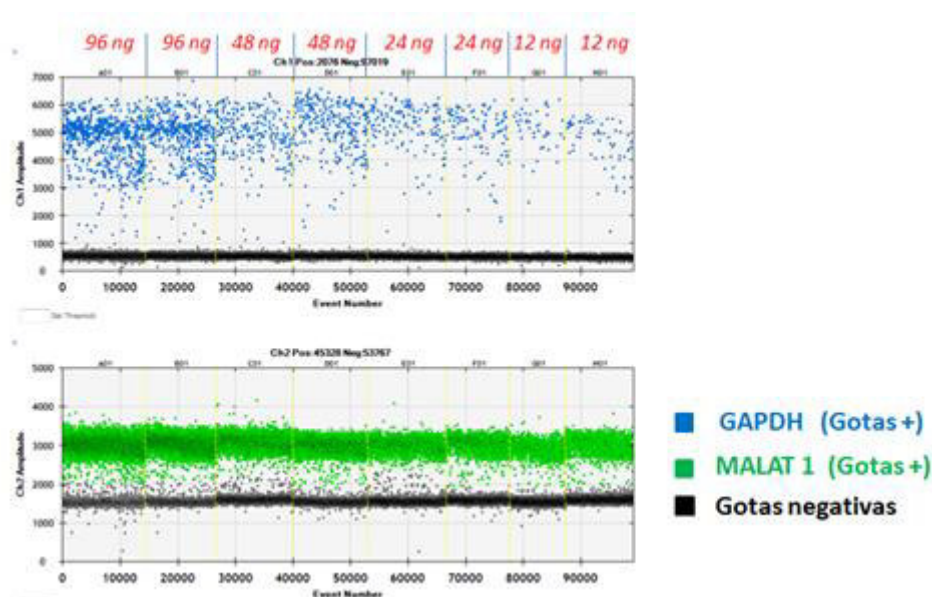


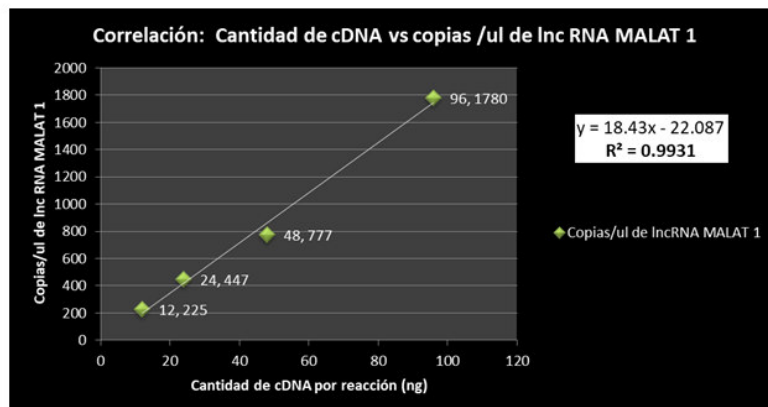
Figura 22. Integración de los gráficos de amplitud de señal. Se presenta la integración de los gráficos de amplitud de 12 a 96 ng por reacción, observándose que hay una adecuada separación entre los clusters de gotas positivas para GAPDH (azul) y MALAT 1 (verde) y sus respectivas gotas negativas (negro).

Se construyeron curvas de calibración para revisar si existía linealidad entre la cantidad de ADNc por reacción y el número de copias de MALAT 1 y GAPDH cuantificadas mediante ddPCR. (Figura 23).

A

VPHstdMALAT1.qb									
BIO-RAD									
Well...	E	Experiment	Sample	T	Target	Status	Conc(copies/μL)	Supermix	Copies/20μLWell
H01	✓	VPHstd	82-1H01	U	GAPDH	OK	6.3	ddPCR Supermix for Pro...	126
H01	✓	VPHstd	82-1H01	U	MALAT1H	OK	225	ddPCR Supermix for Pro	4500

Cantidad de cDNA	Copias/ul de lncRNA MALAT 1
12	225
24	447
48	777
96	1780



B

BIO-RAD

VPHstdMALAT1.qb									
Well...	E	Experiment	Sample	T	Target	Status	Conc(copies/μL)	Supermix	Copies/20μLWell
H01	C	VPHstd	82-1H01	U	GAPDH	OK	6.3	ddPCR Supermix for Pro...	126
H01	C	VPHstd	82-1H01	U	MALAT1H	OK	225	ddPCR Supermix for Pro...	4500

Cantidad de cDNA	Copias/ ul de GAPDH
12	6.3
24	12.3
48	23
96	54

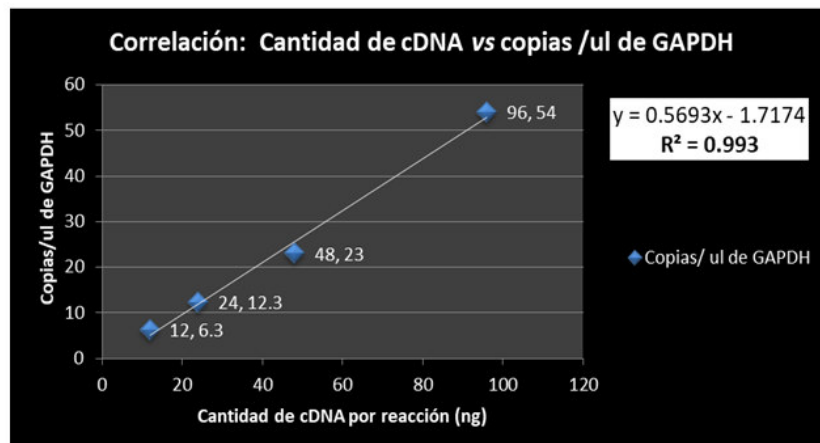


Figura 23. Curvas de correlación de ADN complementario y número de copias por microlitro de MALAT 1 y GAPDH. A) Se observa que existe una correlación lineal entre la cantidad de ADNc y número de copias de MALAT 1 ($R^2 = 0.9931$). B) Se observa que existe una correlación lineal entre la cantidad de ADNc y número de copias de GAPDH ($R^2 = 0.993$).

Habiendo evidenciado que existe una linealidad en el rango de concentración de trabajo se realizó un análisis más fino para determinar la cantidad de ADNc ideal y decidimos trabajar con reacciones de 48 ng por reacción, debido a que presentaban clúster de gotas

positivas y negativas diferenciados y bandas uniformes en el histograma de amplitud de señal. (Figura 24).

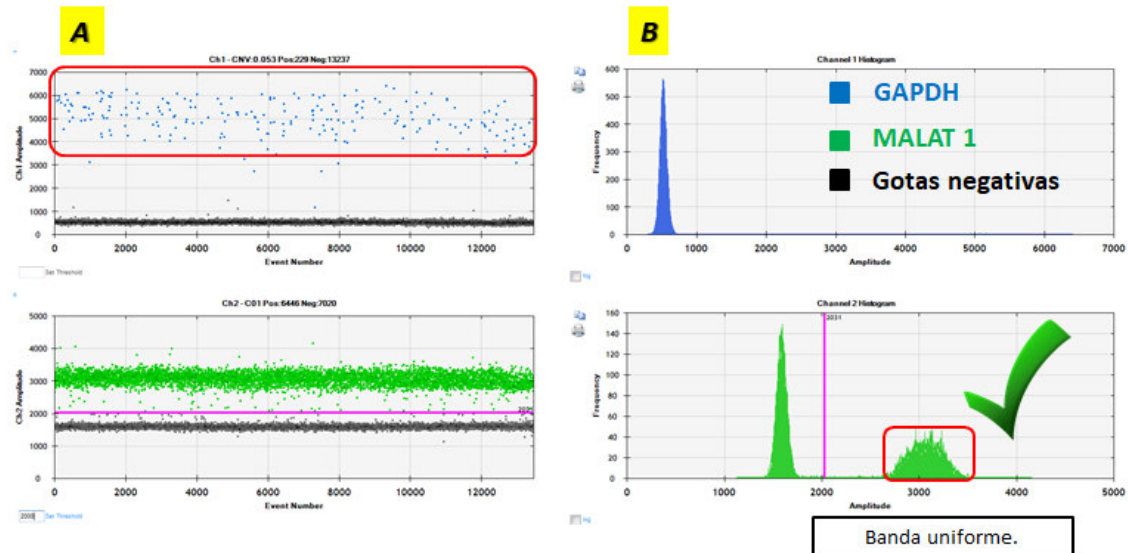


Figura 24. Gráfico de amplitud de señal e histograma de amplitud de señal (48 ng por reacción). A) Gráfico de amplitud de señal. Se observan clúster de gotas negativas y positivas diferenciados. **B) Histograma de amplitud de señal.** Se observan bandas definidas, correspondientes a gotas positivas y negativas de GAPDH y MALAT 1. Por lo tanto decidimos trabajar con esta cantidad de ADNc para realizar la cuantificación de MALAT 1 y GAPDH en CBL.

2.2 Cuantificación de MALAT 1 y GAPDH en muestras de CBL mediante ddPCR.

Se analizaron 67 muestras de CBL, de las cuales se obtuvieron el número de copias de MALAT1 y GAPDH por microlitro, a partir de estos datos se determinó la relación o cociente de MALAT 1/GAPDH y se realizó el análisis con el paquete estadístico SPSS, buscando asociaciones con variables tales como: estatus del VPH (+/-), grado de la lesión, coinfección y carga viral mediante qPCR. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

2.2.1 Cociente No. de copias MALAT 1 / GAPDH.

Se encontró una asociación entre la sobreexpresión de MALAT 1 y la positividad de VPH ($p=0.008$) y carga viral alta ($p=0.027$), no se encontró asociación con el grado de la lesión ($p=0.756$) ni coinfección (0.237) (Figura 25).

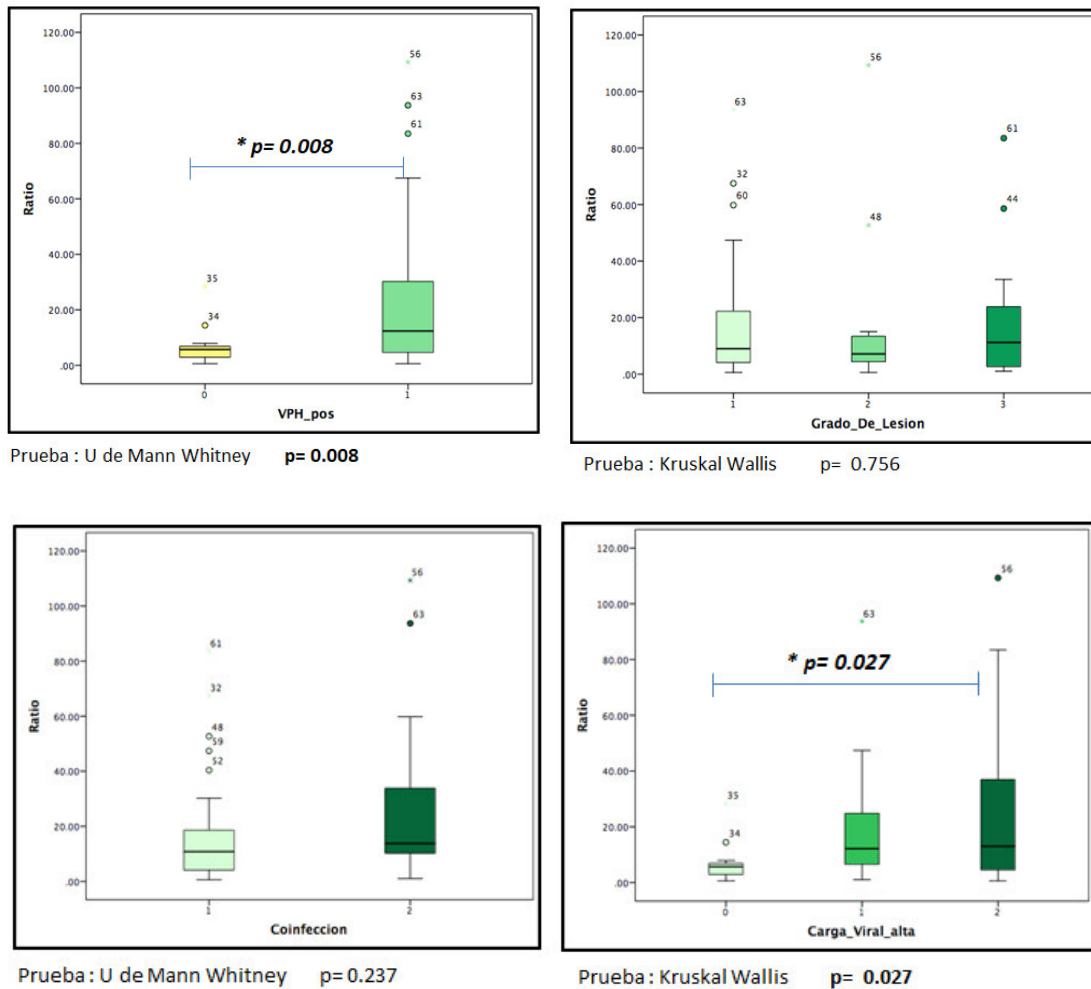


Figura 25. Resultados del análisis estadístico del cociente de No. de copias MALAT1/GAPDH. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar muestras VPH negativas y positivas y muestras con carga viral alta, no se encontró significancia estadística al comparar la expresión en muestras coinfectadas ni entre los diferentes grados de la lesión.

2.2.2 No. de copias MALAT 1 / ul.

Se encontró una asociación entre el aumento en el número de copias absoluto de MALAT 1 y la positividad de VPH ($p=0.016$), coinfección ($p=0.027$) y carga viral baja ($p=0.035$), no se encontró asociación con el grado de la lesión ($p=0.585$). (Figura 26).

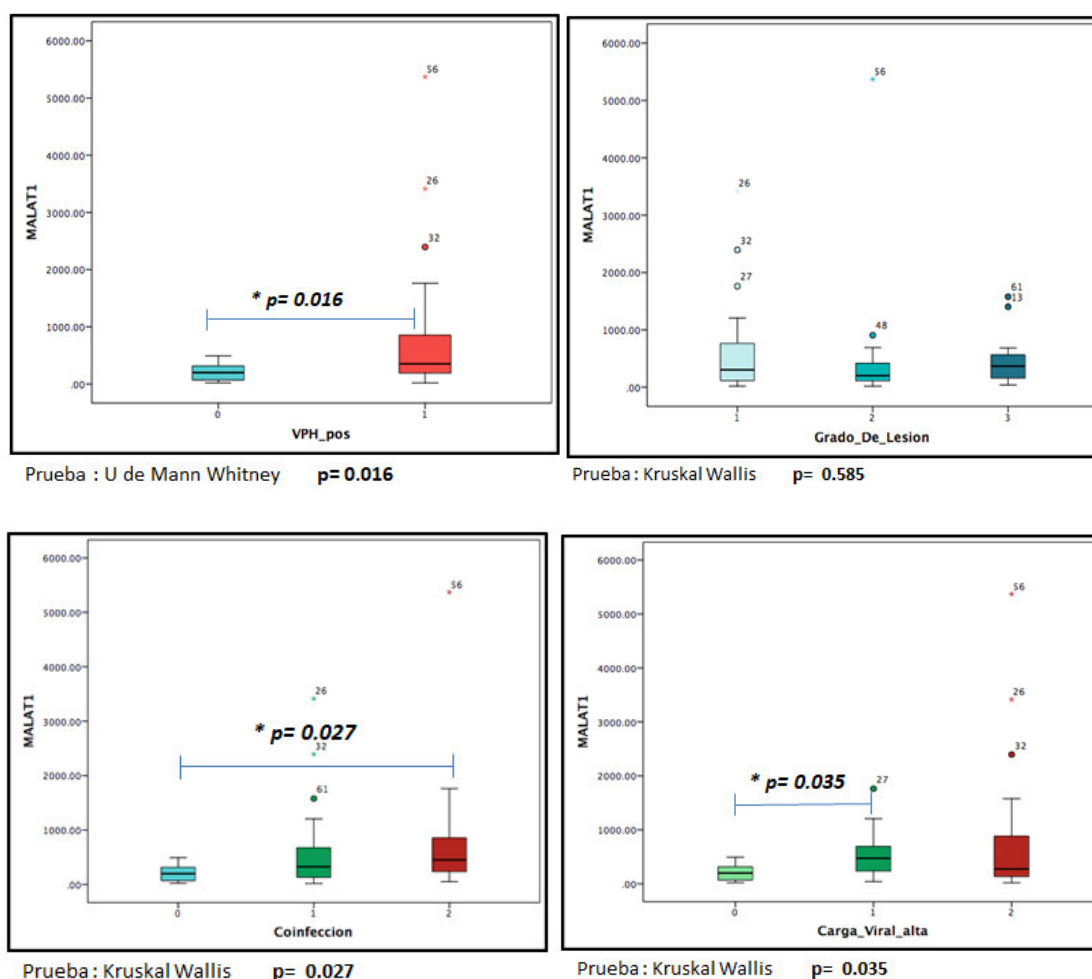


Figura 26. Resultados del análisis estadístico del No. de copias absoluto de MALAT1. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar muestras VPH negativas y positivas ($p=0.016$), muestras VPH negativas y coinfectadas ($p=0.027$) y con carga viral baja (0.035), no se encontró significancia estadística al comparar la expresión entre los diferentes grados de la lesión ($p=0.585$).

3.- Cuantificar los niveles de expresión del miR-34a en muestras de citología en base líquida (CBL).

Se analizaron 29 muestras de CBL (15 VPH negativas, 14 VPH positivas), de las cuales se obtuvieron el número de copias de miR34a y RNU6B por microlitro, a partir de estos datos se determinó la relación o cociente de miR34a/RNU6B y se realizó el análisis con el paquete estadístico SPSS, buscando asociaciones con variables tales como: Estatus del VPH (+/-), grado de la lesión, coinfección y carga viral mediante qPCR. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

Se encontró una asociación entre la subexpresión de miR34a y la positividad de VPH ($p=0.010$), monoinfección ($p=0.021$), coinfección ($p=0.030$), carga viral baja ($p=0.042$) y alta ($p=0.014$), no se encontró asociación con el grado de la lesión ($p=0.190$) (Figura 27).

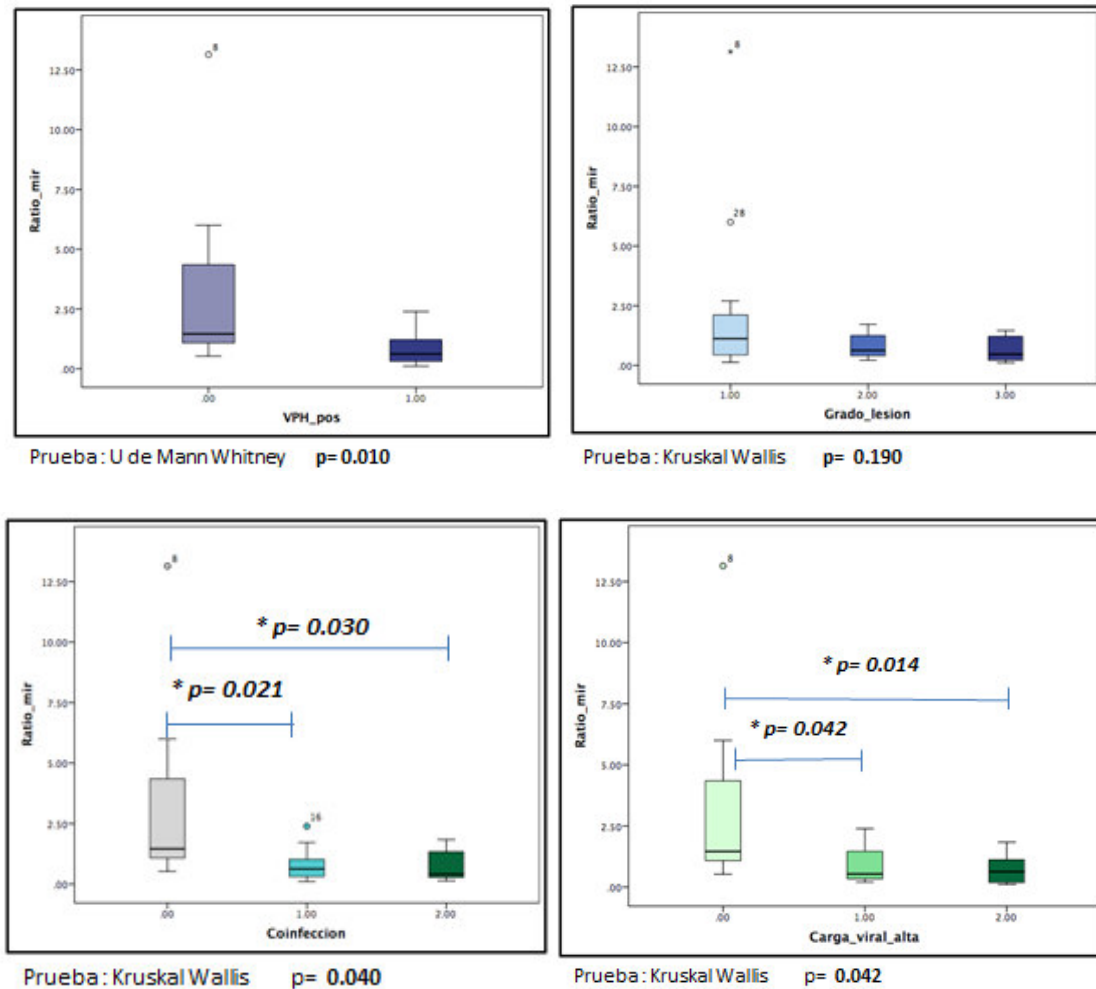


Figura 27. Resultados del análisis estadístico del cociente del No. de copias de miR34a/RNU6B. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar muestras VPH negativas ($n=15$) y positivas ($n=14$) ($p=0.010$), muestras VPH negativas con monoinfectadas (0.021), coinfectadas ($p=0.030$), con carga viral baja (0.042) y alta (0.014), no se encontró significancia estadística al comparar la expresión entre los diferentes grados de la lesión ($p=0.190$).

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación se discutirán los resultados obtenidos de acuerdo al orden de los objetivos planteados:

Objetivo 1 Seleccionar los grupos de estudio y explorar la cuantificación viral de VPH's de alto riesgo mediante ddPCR

Con respecto a la detección y cuantificación de VPH de alto riesgo, es la primera vez que se realiza una exploración empleando la química de Evagreen mediante ddPCR. Anteriormente en un trabajo de Lillsunde G. 2017 se realizó la detección y cuantificación de VPH 16, 18,33 y 45 empleando el equipo QX200 ddPCR mediante la química de sondas Taqman. El diseño de dicho trabajo fue dúplex, es decir en una reacción analizaban un tipo de VPH junto a beta globina como control de amplificación (46).

Hablando específicamente del VPH 16, ellos analizaron 33 muestras estimando el número de copias por célula mediante ddPCR y realizaron la comparación con datos previos de qPCR, encontrando relación o cociente qPCR/ddPCR de 1 a 33 veces, atribuyendo las variaciones a diferencias metodológicas entre ddPCR y qPCR o posibles errores experimentales. En las muestras analizadas en este trabajo obtuvimos una relación o cociente qPCR/ddPCR de 0.1 a 3, esto nos da un indicio de que la metodología empleada nos permitió obtener resultados similares entre ddPCR y qPCR. Además encontramos una correlación lineal positiva entre los datos obtenidos por ddPCR y qPCR.

Con respecto a VPH 18, Lillsunde G. 2017 no determinaron la relación o cociente qPCR/ddPCR. En nuestro estudio la relación o cociente qPCR/ddPCR fue de 0.02 a 0.9, lo cual nos puede brindar un indicio que hay concordancia entre ambas metodologías. A diferencia de ellos nosotros realizamos el diseño y la estandarización para detectar y cuantificar VPH 51, sin embargo no determinamos la relación o cociente qPCR/ddPCR.

Es importante mencionar que al haber realizado el diseño mediante la química de Evagreen, nos da la ventaja de adaptarlo en un futuro a un diseño multiplex, debido a que obtuvimos amplicones para cada tipo de VPH y controles internos con diferentes amplitudes (intensidad) de fluorescencia, permitiendo posiblemente ser detectados en

una misma reacción 1 o 2 tipos de VPH con su control interno de GAPDH y beta globina (Tabla 8).

Objetivo 2 Cuantificar los niveles de expresión del lncRNA MALAT 1 en muestras de citología en base líquida.

El lncRNA MALAT 1, aunque el transcrito maduro no posee una cola de poli (A), es estabilizado por una estructura triple helicoidal 3', y es retenido en el núcleo donde se cree que forma andamios moleculares para estabilizar los complejos de ribonucleoproteínas. Dentro de sus funciones se ha reportado que puede actuar como un regulador transcripcional para numerosos genes implicados en la metástasis del cáncer y la migración celular, y está involucrado en la regulación del ciclo celular. Su regulación positiva en tejidos con cáncer se ha asociado con la proliferación y metástasis de células tumorales (50). Ha sido estudiado en diversos tipos de cáncer tales como pulmón, hígado, colon, CaCU entre otros (51).

Nosotros al igual que un reporte previo de Jian Y (2014) encontramos una expresión de MALAT 1 asociada a la positividad del VPH (Tabla 13) (16). En el trabajo de Jian Y realizado en una población China, analizaron 64 casos identificando la expresión de MALAT 1 en 6 de 18 casos de pacientes sin lesión VPH positivas y 14 de 22 casos de pacientes con lesión VPH positivas, mientras que en 24 casos de pacientes VPH negativas no detectaron expresión, debido a esto ellos sugieren que la infección por VPH es uno de los factores importantes que llevan a la activación de MALAT 1 (16). Destacamos que en nuestro trabajo se asoció la sobreexpresión con la positividad del VPH y a una alta carga viral. A su vez nosotros al implementar la ddPCR fue posible que analizáramos la expresión absoluta de MALAT 1, siendo el primer reporte que asocia alto número de copias con la positividad del VPH, coinfección y carga viral en muestras de CBL.

Se ha propuesto que MALAT 1 es capaz de inducir la transición epitelio mesenquimal (TEM) mediante diversos mecanismos, entre ellos se menciona la disminución de marcadores epiteliales E-cadherina y ZO-1 y aumento de marcadores mesenquimales B-catenina y vimentina, por lo tanto se sugiere que MALAT 1 es capaz de promover la invasión en CaCU y la metástasis mediante la TEM; incluso se ha sugerido su inhibición como posible blanco terapéutico (52).

Nosotros detectamos desregulación en muestras de pacientes VPH positivas sin lesión, VPH positivas con lesiones premalignas de bajo y alto grado, es decir desregulado desde

etapas tempranas previas al CaCU, es por esto que lo proponemos como un posible biomarcador temprano de riesgo a CaCU. Además, es importante mencionar que nuestro estudio es uno de los primeros en asociarlo a coinfección del VPH y con la carga viral.

Ya se ha realizado la detección de esta molécula mediante ddPCR en líneas celulares, por ejemplo en un estudio realizado en el 2014 se detectó alrededor de 3000 copias/cel en la línea celular Hela (51). También se han analizado en diversos tipos de cáncer como próstata, mama, pulmón, cabeza y cuello, cérvix entre otros, sin embargo no se ha trasladado a la clínica (41, 42, 53, 54, 55,56).

Es importante continuar con los estudios de investigación que permitan la búsqueda, validación e implementación de biomarcadores para la detección oportuna de pacientes con riesgo a cáncer, y para esto MALAT 1 ha demostrado ser un posible candidato.

Objetivo 3 Cuantificar los niveles de expresión del miR-34a en muestras de citología en base líquida.

El miR34a es un miembro de la familia miR-34 altamente conservada. Este miRNA actúa como un supresor tumoral y la desregulación o pérdida del gen del huésped está asociado con la progresión del cáncer en numerosos tipos de células (57). Se han realizado múltiples estudios en diferentes tipos de cáncer como pulmón, mama, colon, CaCU, entre otros (57).

Respecto al CaCU y lesiones premalignas, se han realizado estudios que analizan en conjunto un grupo de miRNAs con el objetivo de analizar si poseen expresión diferencial que permita identificar el grado de la lesión y el riesgo a CaCU.

Nuestro grupo de investigación encontró que la subexpresión del miR34a está asociada a la positividad del VPH ($p=0.010$) y existe una tendencia a la baja con respecto al grado de la lesión ($p=0.190$), monoinfección ($p=0.021$), coinfección ($p=0.030$) y a la carga viral baja ($p=0.042$) y alta ($p=0.014$).

Comparando esto con lo reportado en la literatura, nuestros resultados coinciden con lo reportado en el trabajo por Li B. y cols (2010), en el cual analizaron 32 muestras VPH negativas y 32 muestras VPH positivas con diferentes grados de lesión mediante RT-PCR, encontrando subexpresión del pri-miR34a asociada a la positividad del VPH y al grado de la lesión (29). También coincide con lo reportado por Tian Q. y cols (2014), donde participaron 1021 mujeres a las cuales se les realizó un Papanicolau y detección del VPH, comparándose la sensibilidad y especificidad de estas dos pruebas con la

expresión de los miR: 424 ,375 ,34a y 218, los cuales se encontraron subexpresados en lesiones de alto grado a comparación de lesiones de bajo grado y citología normal ($p<0.05$). Se reportó también que la detección del miR-424 y miR-375 permite una mayor sensibilidad (76 y 74 % frente a 63.8 %, $p<0.05$), un mayor valor predictivo y mejorar la especificidad para detectar lesiones de alto grado (58). A su vez coincide con lo reportado por Reka K. (2015), en dicho trabajo se encontró una expresión significativamente más baja en lesiones de alto grado a comparación de lesiones de bajo grado ($p=0.041$), también se encontró la subexpresión asociada al VPH 16 e infecciones múltiples (coinfección) (69).

Esta expresión diferencial dependiendo del tipo de la lesión y positividad del VPH se explica debido a que hay reportes que sugieren que los niveles reducidos de miR34a dependen del gen de supresión tumoral p53 directa o indirectamente por la acción de la proteína E6 del VPH de alto riesgo. El mecanismo que se propone es que probablemente la proteína E6 desestabiliza la proteína p53, inhibiendo la expresión de miR34a, induciendo así el inicio de la transformación celular (29).

Nosotros detectamos una tendencia de subexpresión del miR-34a incluso en tejido normal VPH positivo, esto nos indica que es posible detectar la acción de la proteína E6 del VPH de alto riesgo en etapas tempranas, lo cual podría ser de utilidad en el área clínica como posible biomarcador temprano de transformación celular.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIÓN

Se logró la genotipificación y cuantificación de VPH de alto riesgo empleando la química de Evagreen en ddPCR. Las relaciones o cocientes qPCR/ddPCR obtenidos nos indican que hay concordancia entre el método diseñado de ddPCR y el método de qPCR. Gracias al diseño que planeamos, se obtuvieron productos amplificados con diferentes amplitudes (intensidad) de fluorescencia, lo cual hace factible que en un futuro podamos adaptar un diseño multiplex, que nos permita detectar 1 o 2 tipos de VPH y un control interno de amplificación simultáneamente (en un tubo de reacción).

Es importante validar los ensayos de genotipificación del VPH con mayor número de muestras y realizar nuevas estandarizaciones para otros de tipo de VPH de interés para nuestra población.

Nuestro estudio permitió asociar el aumento en el número de copias del lncRNA MALAT 1 en CBL con la positividad de VPH, la coinfección y la carga viral, y proponerlo como posible biomarcador temprano en lesiones premalignas.

La cuantificación absoluta del miR34a mostró una subexpresión asociada a la mono infección, la coinfección, la carga viral y una tendencia a la baja con el grado de la lesión (creemos que aumentando el número de muestras esta tendencia podría ser estadísticamente significativa), lo cual podría ser de utilidad en el área clínica como posible biomarcador temprano de transformación celular.

En la actualidad existe la necesidad de biomarcadores sensibles y específicos que permitan detectar pacientes con riesgo a CaCU. La evaluación de lnc RNAs y miRNAs podría ser de gran utilidad para clasificar los grados de la lesión, ayudar a predecir el estatus de VPH, monoinfección, coinfección y/o carga viral, al estar implicados en la regulación en vías de señalización importantes para la proliferación y supervivencia celular.

La hipótesis se cumplió parcialmente ya que los niveles de expresión del lncRNA MALAT 1 y el miR-34a, están asociados con el estatus del VPH, coinfección y carga viral, pero no con el grado de las lesiones precursoras del CaCU.

Finalmente destacamos la importancia de validar biomarcadores tempranos de lesiones premalignas para la detección de mujeres con riesgo a CaCU, y sin duda, los miRNAs y lncRNAs han mostrado resultados alentadores, siendo de forma prometedora los “**biomarcadores del futuro**”.

Referencias Bibliográficas.-

- 1.-Ministerio de Salud. Guía Clínica de cáncer cervicouterino. Santiago: Minsal, 2015 ISBN: 978-956-8823-54-2
- 2.-Ferlay J (2012) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer 2014.
- 3.-Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 27 July 2017
- 4.-Secretaria de Salud (<https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadística>).
- 5.-George P. (1943) Cancer of the uterus: the vaginal smear in the diagnosis California and Western. Cal West Med. 1943 Aug; 59(2): 121–122.
- 6.- Astudillo O. (2014) Diagnóstico molecular del virus del papiloma humano. Panorama Médico ; Vol 8,1 64-69
- 7.-Lacruz C. (2001) Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001) Rev esp patol; Vol 36,1: 5-10
- 8.-Flippo R. (2016) Cancer subtypes classification using long non-coding RNA. Oncotarget. 7(33): 54082–54093.
- 9.-Luka B. (2017) Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer. Dis Markers Published online 2017 May 29. doi: 10.1155/2017/7243968PMCID: PMC5467329
- 10.-Zhu H. (2017) Long non-coding RNA expression profile in cervical cancer tissues Published online on: June 6, 2017
- 11.-Bartonicek N. (2016) Long noncoding RNAs in cancer: mechanisms of action and technological advancements. Mol Cancer. 2016; 15: 43. Published online 2016 May 27. doi: 10.1186/s12943-016-0530-6 PMCID: PMC4884374
- 12.-Chang H. (2016) Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways Cancer Cell. 2016 Apr 11; 29(4):452-463. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.

- 13.-Arita T. (2013) Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer Research*. 2013;33(8):3185–3193
- 14.-Gibb A. (2012) Aberrant Expression of Long Noncoding RNAs in Cervical Intraepithelial Neoplasia *International Journal of Gynecological Cancer*. 22(9):1557–1563.
- 15.-Jung K. (2015) Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. *Int J Oncol*. 2015 Feb; 46(2): 521–530. Published online 2014 Nov 17. doi: 10.3892/ijo.2014.2758
- 16.-Jiang Y. (2014) The role of MALAT1 correlates with HPV in cervical cancer. *Oncol Lett*. 2014 Jun;7(6):2135-2141. Epub 2014 Mar 24.
- 17.-Yang L. (2015) High MALAT1 expression predicts a poor prognosis of cervical cancer and promotes cancer cell growth and invasion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Sep;19(17):3187-93.
- 18.-Xu S. (2015) Downregulation of long noncoding RNA MALAT1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K-AKT pathway in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 May 1;8(5):4881-91.
- 19.-Hua Z. (2017) Long non-coding RNA expression profile in cervical cancer tissues *Oncol Lett*. 2017
- 20.-Luo M. (2015) Aberrant expression of microRNA-26b and its prognostic potential in human cervical cancer *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 May 1;8(5):5542-8.
- 21.-Winter J. (2012) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11: 228-23
- 22.-Min L. (2015) Expresión aberrante de microRNA-26b y su potencial pronóstico en cáncer de cuello uterino humano *Int J Clin Exp Pathol* . 2015; 8 (5): 5542-5548.
- 23.-Melar N. (2010) Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins. *J Virol*. 2010;84:5212–5221

- 24.-Wang X. (2009) RNA.Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. 2009 Apr;15(4):637-47. doi: 10.1261/rna.1442309.
- 25.-Yeung C. (2017) Human papillomavirus type 16 E6 suppresses microRNA-23b expression in human cervical cancer cells through DNA methylation of the host gene C9orf3 *Oncotarget* 2017 Feb 14; 8(7): 12158–12173
- 26.-Martinez I. (2008) Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene*. 2008;27:2575–2582.
- 27.-Xiao H. (2014) MicroRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111 (11):4262-7.
- 28.-Gerard J. (2010) Strong Inverse Correlation Between MicroRNA-125b and Human Papillomavirus DNA in Productive Infection *Diagn Mol Pathol*. 2010 19(3): 135–143.
- 29.-Li B. (2010) Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection *Int J Cancer*. 2010 ; 129(6): 1362–1372.
- 30.-Sun L. (2017) MicroRNA-425-5p is a potential prognostic biomarker for cervical cancer *Ann Clin Biochem*.2017;54 (1):127-133
- 31.-Sunyoung P. (2017) MiR-9, miR-21 y miR-155 como biomarcadores potenciales para el cáncer cervical positivo y negativo para VPH[†] ,*BMC Cancer* 201717 : 658
- 32.-Ai-Hua C. (2017) MiR-34a and miR-206 act as novel prognostic and therapy biomarkers in cervical cancer. *Cancer Cell Int*. 2017; 17: 63.2017 Jun 9. doi: 10.1186/s12935-017-0431-9 PMCID: PMC5466768
- 33.-Sykes P. (1992) Quantitation of targets for Pcr by use of limiting dilution. *BioTechniques*. 1992;13:444–449
- 34.-Mazaika E. (2014) Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications. *Current Protocols in Human Genetics* 2, 7.24.1–7.24.13. <http://doi.org/10.1002/0471142905.hg0724s82>
- 35.-Clementi M. (2015) Are three generations of quantitative molecular methods sufficient in medical virology? *Brief Rev. New Microbiol*. 2015;38:437–441

- 36.-Droplet Digital PCR Applications Guide QX200 Biorad
- 37.-Olmedillas S. (2017) Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology Molecular Diagnosis & Therapy October 2017, Volume 21, Issue 5, pp 493–510
- 38.-Ma J. (2013) Quantification of Plasma miRNAs by Digital PCR for Cancer Diagnosis. *Biomarker Insights*, 8, 127–136. <http://doi.org/10.4137/BMI.S13154>
- 39.-Ferracin M. (2015) Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients. *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(16):14545-55.
- 40.-Mangolini L. (2015) Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. *Biomarker Research* 3:12 DOI 10.1186/s40364-015-0037-0
- 41.-David W. (2013) Digital Quantitation of Potential Therapeutic Target RNAs Dodd, *Nucleic Acid Ther.* 2013 Jun; 23(3): 188–194. doi: 10.1089/nat.2013.0427
- 42.-Lee B. (2014) Long Noncoding RNAs as Putative Biomarkers for Prostate Cancer Detection *The Journal of Molecular Diagnostics* Volume 16, Issue 6, 615-626
- 43.-Jeannot E. (2016) Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 2(4), 201–209. <http://doi.org/10.1002/cjp2.47>
- 44.-Kang Z. (2017) Circulating Cell-free DNA for Metastatic Cervical Cancer Detection, Genotyping, and Monitoring DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1553
- 45.-Lee J. (2017) Predicting response to radical (chemo) radiotherapy with circulating HPV DNA in locally advanced head and neck squamous carcinoma. *Cancer*. 2017 Sep 5;117 (6):876-883. doi: 10.1038/bjc.2017.258.
- 46.-Larsson G. (2017). Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45 - a short report. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 40(5), 521–527

- 47.-Ortiz J. (2015) Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico *Virology Journal* 2015
- 48.-Fajardo O. (2016) Prevalence and 3-year persistence of human papillomavirus serotypes in asymptomatic patients in Northern Mexico. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2016;136 (1), 40-46
- 49.-Ojesina, A. et al. (2014) Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*, 2014 20;506(7488):371-5. doi: 10.1038/nature12881
- 50.-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/378938#gene-expression>).
- 51.-Keith T. (2013) Digital Quantitation of Potential Therapeutic Target RNAs *Nucleic Acid Ther.* 2013 Jun; 23(3): 188–194.doi: 10.1089/nat.2013.0427
- 52.-Sun R. (2016) Down-regulation of MALAT1 inhibits cervical cancer cell invasion and metastasis by inhibition of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biosyst.* 2016 Mar;12 (3):952-62. doi: 10.1039/c5mb00685f.
- 53.-Kacper G. (2017) lncRNA in HNSCC: challenges and potential. *Contemp Oncol (Pozn)* ; 21(4): 259–266. Published online 2017 Dec 30. doi: 10.5114/wo.2017.72382
- 54.-Rapisuwon S. (2016) Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol* 1;14:211-22. doi: 10.1016/j.csbj.2016.05.004.
55. Reis E. (2012) Perspectives of long non-coding RNAs in cancer diagnostics. *Frontiers in Genetics.* 2012; 3 (32):p. 32. doi: 10.3389/fgene.2012.00032.
56. Silva A. (2015) The clinical relevance of long non-coding RNAs in cancer. *Cancer.* 2015; 7(4):2169–2182. doi: 10.3390/cancers7040884.
- 57.-Information gen Mir-34a (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/407040>)
- 58.-Qifang T. (2014) MicroRNA Detection in Cervical Exfoliated Cells as a Triage for Human Papillomavirus–Positive Women *Journal of the National Cancer Institute*, Volume 106, Issue 9
- 59.-Reka K. (2015) MicroRNA Expressions in HPV-induced Cervical Dysplasia and Cancer *Anticancer research* 35(1):523-30.